



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การแยกหายีน Glutathione S-transferase (GSTs) ใหม่
และการศึกษาคุณลักษณะจากยุงพาหะนำโรคมalaria เรื้อรัง
Anopheles dirus ในไทย

โดย

ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต และคณะ

พฤษภาคม 2548

สัญญาเลขที่ TRG4580033

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแยกหายีน Glutathione S-transferase (GSTs) ใหม่ และการศึกษาคูณลักษณะ
จากยุงพาหะนำโรคมาลาเรีย *Anopheles dirus* ในไทย

คณะผู้วิจัย

ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ร.ศ. ดร. Albert Kettermann สถาบันอนุชีวิวิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ดร. ละเอียด ประพันธ์ดารา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ Associated Professor Albert Ketterman และ ดร. ละเอียด ประพันธ์ดารา นักวิจัยพี่เลี้ยงที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือทั้งทางเทคนิคและสารเคมี ตลอดจนกำลังใจในการวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงมาได้

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนทางการเงิน ตลอดจนโอกาสที่ให้การวิจัยครั้งนี้

แสงทอง พงษ์เจริญกิต

พฤษภาคม 2548

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4580033

ชื่อโครงการ : การแยกหายีน Glutathione S-transferase (GSTs) ใหม่และการศึกษาคุณลักษณะ

จากยุงพาหะนำโรคมalariaเรีย *Anopheles dirus* ในไทย

ชื่อนักวิจัย : ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

E-mail address: saengton@mju.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี 1 กรกฎาคม 2545- 31 พฤษภาคม 2548

เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (Glutathione S-transferases; GSTs) เป็นกลุ่มเอนไซม์พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีบทบาทในการต้านทานสารพิษ เอนไซม์ GSTs ของแมลงเกี่ยวข้องกับความสามารถต้านทานต่อ DDT และสารฆ่าแมลงกลุ่ม pyrethroid ที่ใช้ในโปรแกรมการควบคุมยุงพาหะมาลาเรีย โดยในยุงพาหะมาลาเรียของแอฟริกา (*Anopheles gambiae*; *An. gambiae*) พบว่าเอนไซม์ GSTe2 สามารถสลาย DDT ได้มากขึ้นในสายพันธุ์ต้านทาน ซึ่งความสามารถต้านทานต่อสารฆ่าแมลงในยุงก้นปล่องพาหะมาลาเรียของไทย (*Anopheles dirus*; *An. dirus*) อาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ GSTs ดังนั้นเพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องนี้จึงต้องแยกยีน *gst* ใหม่ก่อน

ในการวิจัยใช้เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) แยกบริเวณรหัสยีน *gst* จากยุง *An. dirus* ได้ 3 ยีน ได้แก่ *Anopheles dirus* glutathione S-transferase epsilon class sequence 1 (*adgste1*), *Anopheles dirus* glutathione S-transferase omega class sequence 1 (*adgstot1*) และ *Anopheles dirus* glutathione S-transferase theta class sequence 1 (*adgstt1*) ยีนทั้ง 3 มีความเหมือนกับยีนกลุ่มเดียวกันในยุง *An. gambiae* 70-90 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกบริสุทธิ์ adGSTe1 ด้วย GSH column เมื่อทดสอบคุณลักษณะทางเอนไซม์ของทั้ง 2 โคลน คือ adGSTe1 WT และ adGSTe1 R139H พบว่าให้ค่า Kinetic parameter แตกต่างกัน ส่วน adGSTT1 นั้นได้ทั้งหมด 4 โคลน แต่แยกบริสุทธิ์ด้วย cationic และ hydrophobic column ได้เพียง 1 โคลน เมื่อทดสอบคุณลักษณะทางเอนไซม์พบว่ามีความเร็วสูงสุดของเอนไซม์ GSTs ที่ได้จากยุง *An. dirus* ในขณะที่ adGSTO1 ชักนำให้แสดงออกได้มากที่สุด แต่ไม่สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการเชื่อมระหว่าง CDNB และ GSH ได้ จึงไม่สามารถแยกบริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์ เนื่องจากยังไม่มีรายงานคุณลักษณะทางเอนไซม์ GST กลุ่ม Theta และ Omega มาก่อนจึงน่าสนใจที่จะศึกษาการทำงานของยีนที่สำคัญที่อนุรักษ์ไว้ในยุงพาหะมาลาเรียทั้ง 2 ชนิด

จากการใช้ Genomic DNA เป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR เมื่ออ่านลำดับเบสของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *adgste1* และ *adgstt1* พบว่าบริเวณรหัสของยีนทั้งสองประกอบด้วย 2 เอกซอน และ 1 อินทอน โดยขนาดของเอกซอนและอินทอนของยีนทั้งสองอนุรักษ์ไว้ในยุง *An. dirus* และยุง *An. gambiae* จึงเป็นไปได้ว่ายีนทั้งสองต้องมีหน้าที่สำคัญที่ต้องอนุรักษ์ในวิวัฒนาการ

คำหลัก : เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส, ยุงก้นปล่อง, การแยกยีน, บริเวณรหัส, โครงสร้างของยีน

Abstract

Project code: TRG4580033

Project Title: Isolation and characterization of novel glutathione S-transferase genes from Thai malaria vector, *Anopheles dirus*.

Investigator: Dr. Saengtong Pongjaroenkit, Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University

E-mail address: saengton@mju.ac.th

Project Period: 3 years 1 July 2002 – 31 May 2005

Glutathione S-transferases (GSTs) are a superfamily of multifunctional enzymes, which are found in most organisms. The GSTs play an important role in the metabolism of toxins such as insecticides by conjugation of toxins to glutathione (GSH; γ -glutamyl-cysteinyl-glycine). Insect GSTs are involved in resistance to DDT and pyrethroid, which is currently used in malaria vector control program. The GSTe2 of *Anopheles gambiae* (*An. gambiae*) has the highest DDTase activity currently observed as well as increased expression in resistant mosquitoes. Thus the resistance of *Anopheles dirus* (*An. dirus*) may be implicated with GSTs. To study the role of GSTs in insecticide resistance, *gst* genes have to be isolated.

Coding region of 3 *gst* genes were isolated by RT-PCR which named as *Anopheles dirus* glutathione S-transferase epsilon class sequence 1 (*adgste1*), *Anopheles dirus* glutathione S-transferase omega class sequence 1 (*adgsto1*) and *Anopheles dirus* glutathione S-transferase theta class sequence 1 (*adgstt1*). They showed 70-90% identity to the orthologous *An. gambiae* *gst* genes. Two clones of adGSTE1 (adGSTE1 WT and adGSTE1 R139H) were purified by GSH affinity chromatography and characterized. The single amino acid change affected the enzyme activity. Four clones of adGSTT1 were obtained but only one clone was purified by cationic and hydrophobic column. The purified adGSTT1 showed the lowest V_{max} among *An. dirus* GSTs characterized to date. Whereas adGSTO1 showed very low activity toward classical GSTs substrates such as 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Therefore the study of adGSTO1 enzyme activity could not be performed. Currently, there is no enzymatic information for theta and omega insect GSTs. Thus, the characterization of these GSTs should be further studied.

The PCR of genomic DNA of *adgste1* and *adgstt1* revealed that the coding region of these *gst* genes is composed of 2 exons and 1 intron. The conservation of exon and intron size in *An. dirus* and *An. gambiae* suggests that these two genes should have an important role.

Keywords: *Anopheles dirus*, Glutathione S-transferase, Gene isolation, Coding region, Gene structure

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

โรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ ซึ่งสาเหตุหนึ่งคือการควบคุมพาหะของโรคที่ไม่ประสบความสำเร็จ ที่มักเกิดจากปัญหาการต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมยุงพาหะนำโรค เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (Glutathione S-transferase; GST) เป็นหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อสารเคมี ที่พบในทุกสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในแมลงพบว่าเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อสารพวก organophosphate และ organochlorine ซึ่งในปัจจุบันพบว่าเอนไซม์นี้ยังเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงกลุ่ม pyrethroid ที่เป็นสารที่ใช้ในโปรแกรมควบคุมยุงพาหะของโรคมาลาเรีย

จากการศึกษาก่อนหน้าในยุงพาหะมาลาเรียของไทย (*An. dirus*) ที่พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับสารฆ่าแมลงหลายชนิด ยีน *gst* ที่แยกได้เมื่อชักนำให้แสดงออกและศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์พบว่าสามารถย่อย DDT ได้ (DDTase activity) และยังสามารถทำปฏิกิริยาได้กับสารกลุ่ม pyrethroid ดังนั้นการศึกษายีน *gst* จากยุง *An. dirus* เพื่อทำให้ทราบกลไกของความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงที่เป็นการทำงานของเอนไซม์ GST ที่เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการควบคุมการใช้สารฆ่าแมลงให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อร้ายแรงชนิดหนึ่งที่เกิดจากเชื้อปรสิตสกุล Plasmodium 4 ชนิดได้แก่ *falciparum*, *vivax*, *ovale* และ *malaria* โดยปรสิต Plasmodium มียุงก้นปล่องเป็นพาหะในการแพร่เชื้อ องค์การอนามัยโลกได้รายงานไว้ว่า ทุกปีประชากรโลกจำนวน 400 ล้านคน จะล้มป่วยเป็นไข้และมีอาการหนาวสั่นด้วยโรคมาลาเรีย และ 2 ล้านคน จะเสียชีวิตด้วยโรคนี้ (ที่มา <http://203.157.44.67/insect/menu/yunghkonplong.php>) ดังนั้นการป้องกันกำจัดยุงก้นปล่องจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคมาลาเรีย ซึ่งในอดีตจะทำได้โดยการกำจัดแหล่งน้ำขังและใช้สารฆ่าแมลง แต่การใช้สารฆ่าแมลงชนิดเดียวกันเป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้ยุงเกิดความต้านทานสารฆ่าแมลงชนิดนั้น ๆ ขึ้น ซึ่งกลไกการต้านทานสารฆ่าแมลงของแมลงมีหลายกลไกแต่ที่สำคัญ คือ กลไกที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (Glutathione S-transferases; GSTs) (Enayati AA. *et. al.* 2005)

กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (E.C.2.5.1.18) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (คน สัตว์ พืช แมลง ปรสิตร รา ยีสต์ แบคทีเรีย) ซึ่งเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส มีบทบาทในการต้านทานสารพิษ โดยการเร่งปฏิกิริยาการเชื่อม (S-conjugation) ระหว่างหมู่ไทโธล (thiol group) ของ glutathione (γ -glutamyl-cystienly-glycine; GSH) กับ electrophilic moiety ใน hydrophobic ของสารตั้งต้นที่เป็นสารพิษ ทำให้สารประกอบที่ได้จากการเชื่อมละลายน้ำได้ดีขึ้นทำให้ความเป็นพิษลดลงหรือสามารถถูกย่อยสลายด้วยกระบวนการย่อยสลาย โดยเอนไซม์อื่น ๆ ต่อไป แล้วขับถ่ายออกจากร่างกาย รูปแบบตามธรรมชาติของโครงสร้างเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรสในไซโตซอล (cytosolic GST) มีลักษณะเป็น dimeric protein ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของ 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกันหรือต่างกันได้แต่จะต้องอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นได้มีความพยายามในการจัดจำแนกกลุ่มของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส ต่างๆ ในช่วงแรกได้มีการจัดจำแนกเอนไซม์นี้ตามความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่เป็นสารอินทรีย์

ต่อมาได้มีการศึกษาแล้วพบว่า เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส แต่ละกลุ่มมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีช่วงเหลื่อมล้ำกันทำให้ยากต่อการจัดจำแนกเป็นกลุ่ม ในปัจจุบันได้มีการจำแนกเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส ที่อยู่ในไซโตซอล (cytosolic GST) ออกเป็น 10 กลุ่ม (class) โดยจะใช้คุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา และลำดับกรดอะมิโนเป็นตัวแบ่งกลุ่ม โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีอยู่ 7 กลุ่ม คือ แอลฟา (Alpha) มิว (Mu) ไพ (Pi) थीตา (Theta) เคปปา (Kappa) ซีตา (Zeta) และโอเมกา (Omega) ในพวกปลาหมึก (cephalopods) จะจัดอยู่ในกลุ่มซิกมา (Sigma) ในพืชจัดอยู่ในกลุ่มฟิ (Phi) และในแมลงจัดอยู่ในกลุ่มเดลตา (Delta) (Hayes and Pulford, 1995; Pemble *et al.*, 1996; Board *et al.*, 1997 Fournier *et al.*, 1992; Toungh *et al.*, 1990; Board *et al.*, 2000) และโดยทั่วๆไปจะใช้ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนเป็นตัวจำแนก โดยหากความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และต่างกลุ่มจะมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกันน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (Mannervik *et al.*, 1992)

จากความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจึงทำให้ไม่สามารถแยกเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วยเทคนิคการแยกบริสุทธิ์โปรตีน เช่น เทคนิค Affinity chromatography จึงไม่สามารถศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์ของเอนไซม์ isoenzyme นั้น ๆ ได้ จึงนิยมการโคลนนิ่งของสมาชิกภายในกลุ่มเดียวกันแล้วแสดงออกใน *E. coli* เพื่อใช้ในการศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์ของแต่ละ isoenzyme ต่อไป

อย่างไรก็ตามข้อมูลของลำดับเบสของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส ในแมลงเริ่มต้นการจำแนกออกเป็น 2 class คือ class I และ class II ตามคุณสมบัติการจับกับ S-hexylglutathione column เป็นตัวแบ่งกลุ่ม หากจับได้จัดเป็น Class I แต่หากจับไม่ได้จัดเป็น Class II (Fournier *et al.*, 1992; Prapanthadara *et al.*, 1993) จากนั้นได้มีการเปลี่ยนระบบการเรียกชื่อใหม่จาก class I และ class II เป็น เดลต้า (Delta) และ ซิกมา (Sigma) ตามลำดับ (Broad *et al.*, 2000)

ต่อมาได้มีการหาลำดับเบสของ cDNA (complementary DNA) ของยีน *gst* กลุ่มซิกมา ในแมลง 2 ชนิดคือ *An. gambiae* และ *D. melanogaster* (*aggst2-1*, *DmGST2*) พบว่ายีนทั้งสองมีเพียง 1 ชุดในจีโนมซึ่งไม่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับลำดับเบสในจีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์อื่น ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่ายีน *gst* กลุ่มเดลต้า ในแมลงมีอยู่หลายชุดและยังมีการรายงานว่าพบแล้วอย่างน้อย 30 ยีนจากแมลงหวี่ (*Drosophila species*), *Musca domestica* (*M. domestica*), *Lucilia cuprina*, ยุงพาหะของทวีปแอฟริกา (*An. gambiae*) (accession no.AF316638, AF316637, AF316636, AF316635, Z71480 (unpublished) และ ยุงก้นปล่องพาหะมาลาเรียของไทย (*An. dirus*) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ GST เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อไพรีทรอยด์ ที่ปัจจุบันใช้เป็นสารควบคุมยุงพาหะนำโรค (Kostaropoulos *et al.*, 2001 and Vantas *et al.*, 2001)

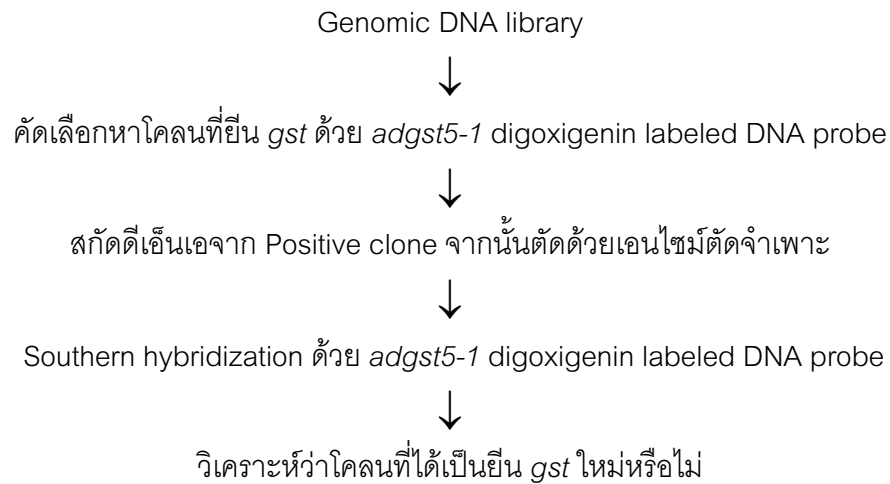
จากการอ่านลำดับเบสจีโนมของยุงพาหะมาลาเรียของโรคมาลาเรีย (*An. gambiae*) คาดว่าจะมียีน *gst* 28 ยีน จำแนกตามความเหมือนกันของกรดอะมิโนอยู่ในกลุ่ม เดลต้า (Delta) थीตา (Theta) โอเมกา (Omega) ซิกมา (Sigma) ซีตา (Zeta) และกลุ่มที่จัดไม่ได้ (Ding Y. *et al.* 2003) จากการศึกษา ยีน *gst* ในยุง *An. gambiae* โดยเฉพาะในกลุ่มเอพซิลอนเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ต่อ DDT (Ranson, H. *et al.* 2001,

Ortelli F. *et al.* 2003) ได้ทำการศึกษายีนของเอนไซม์ GST ในการต้านทาน DDT ของยุงพาหะนำโรค มาลาเรีย พบว่าตำแหน่งที่มีการต้านทานต่อ DDT อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 3 division 33B และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสในจีโนมของ *An. gambiae* พบว่ากลุ่มยีน *gst* กลุ่มเอพซิลอน (epsilon) อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันนี้ จากการศึกษายีน *GSTe2* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในยุงสายพันธุ์ต้านทานยาฆ่าแมลง และมีคุณสมบัติเป็น DDTase สูงที่สุด และจากการวิเคราะห์โดย quantitative PCR เมื่อใช้ cDNA เป็นแม่พิมพ์ เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของสมาชิกทั้ง 8 ในกลุ่มเอพซิลอน (*GSTe1*, *GSTe2*, *GSTe3*, *GSTe4*, *GSTe5*, *GSTe6*, *GSTe7* และ *GSTe8*) ทั้งในยุงสายพันธุ์ที่ต้านทานและไม่ต้านทานยาฆ่าแมลง พบว่าสมาชิกจำนวน 5 ใน 8 ของกลุ่มเอพซิลอน (*GSTe1*, *GSTe2*, *GSTe3*, *GSTe4* และ *GSTe7*) แสดงออกในระดับที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในยุงสายพันธุ์ต้านทานยาฆ่าแมลง โดยเฉพาะในยีน *GSTe2* และยีน *GSTe7* และเมื่อทำ quantitative PCR ซ้ำอีกครั้งโดยใช้ genomic DNA เป็นแม่พิมพ์ พบว่าจำนวนชุดของยีนที่ได้แตกต่างจากผลที่ได้จากการใช้ cDNA เป็นแม่พิมพ์ ดังนั้นสมาชิกทั้ง 4 ในกลุ่มเอพซิลอน คือ *GSTe1*, *GSTe3*, *GSTe5* และ *GSTe7* ในสายพันธุ์ที่ต้านทานและไม่ต้านทานยาฆ่าแมลงจะมีจำนวนชุดยีนเท่ากัน (Ding Y. *et al.* 2003) ซึ่งการศึกษาบริเวณ Promoter ของยีน *GSTe2* พบว่าแตกต่างกันในยุงสายพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทาน ทำให้ในยุงสายพันธุ์ต้านทานมีระดับการถอดรหัสมากกว่ายุงสายพันธุ์ไม่ต้านทาน 2.8 เท่า ในขณะที่ยีน *GSTe3* เพิ่มขึ้นเพียง 1.3 เท่า และยังพบว่า regulatory element ที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress (FOX L1; Forkhead box L1, NF- κ B; Nuclear factor κ B และ AhR; aryl hydrocarbon receptor) ที่อาจเกิดจากสารภายในและภายนอกของเซลล์ ภายในบริเวณ promoter ของยีน *GSTe2* ด้วย ซึ่งเมื่อทดสอบด้วยการใช้ H_2O_2 พบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *GSTe1*, *GSTe2* และ *GSTe3* ในยุงพันธุ์ต้านทาน ในขณะที่ในยุงพันธุ์ต้านทานพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเฉพาะยีน *GSTe3* เท่านั้น (Ding Y. *et al.* 2005)

ปัจจุบันสามารถแยกยีน *gst* จากยุง *An. dirus* ทั้งหมด 3 ยีน ที่เป็นยีนในกลุ่ม delta ได้แก่ *adgstIASI*, *adgst1-5*, *adgst4-1* (Pongjaroenkit S. *et al.* 2001, Jirajoenrat K. *et al.* 2001, Udomsinprasert, R. and Kettermann, A.J. 2002) โดยยีน *adgstIASI* มีโครงสร้างเป็น alternative splicing สามารถเลือกเอ็กซอน 3 ได้ 4 แบบ ทำให้ได้โปรตีนที่แตกต่างกัน 4 เอนไซม์ที่เรียกว่า adGSTD1-1, adGSTD2-2, adGSTD3-3, adGSTD4-4 ต่อมา โปรตีนจากยีน *adgst1-5* เปลี่ยนชื่อเป็น adGSTD5-5 ส่วนโปรตีนจากยีน *adgst4-1* ก็ได้เปลี่ยนชื่อเป็น adGSTD6-6 (Udomsinprasert, R. *et al.* 2005) ซึ่งทั้งสามยีนนี้มียีนเดียวกันในยุง *An. gambiae* ดังนั้นยีน *gst* อื่นๆ ของยุง *An. gambiae* ก็ควรพบในยุง *An. dirus* เช่นกัน ซึ่งยีนในกลุ่ม epsilon เป็นกลุ่มที่น่าสนใจเนื่องจากพบว่าในยุง *An. gambiae* เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อ DDT

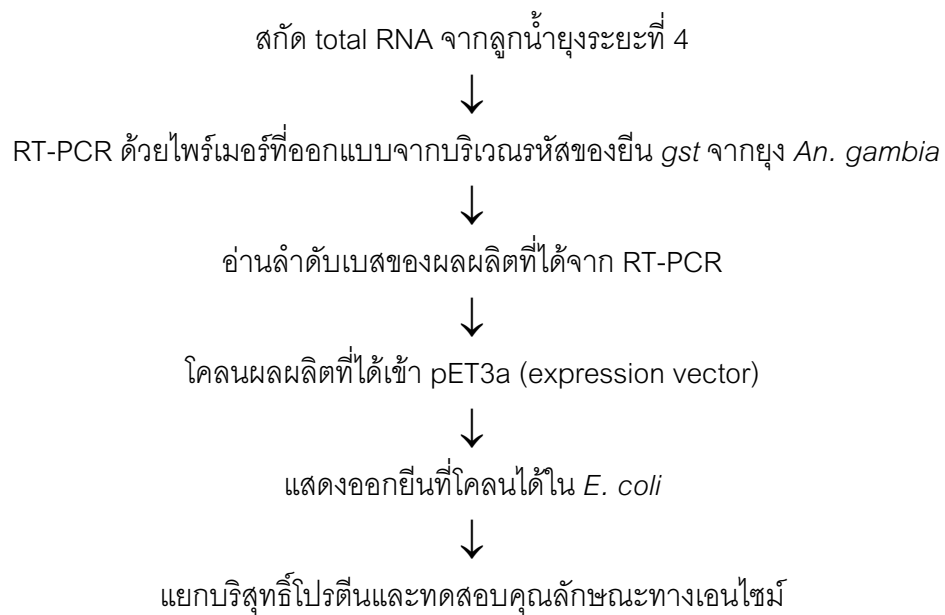
การทดลองมี 2 ขั้นตอน และแต่ละมีขั้นตอนมีรายละเอียด คือ

1. Genomic DNA library Screening

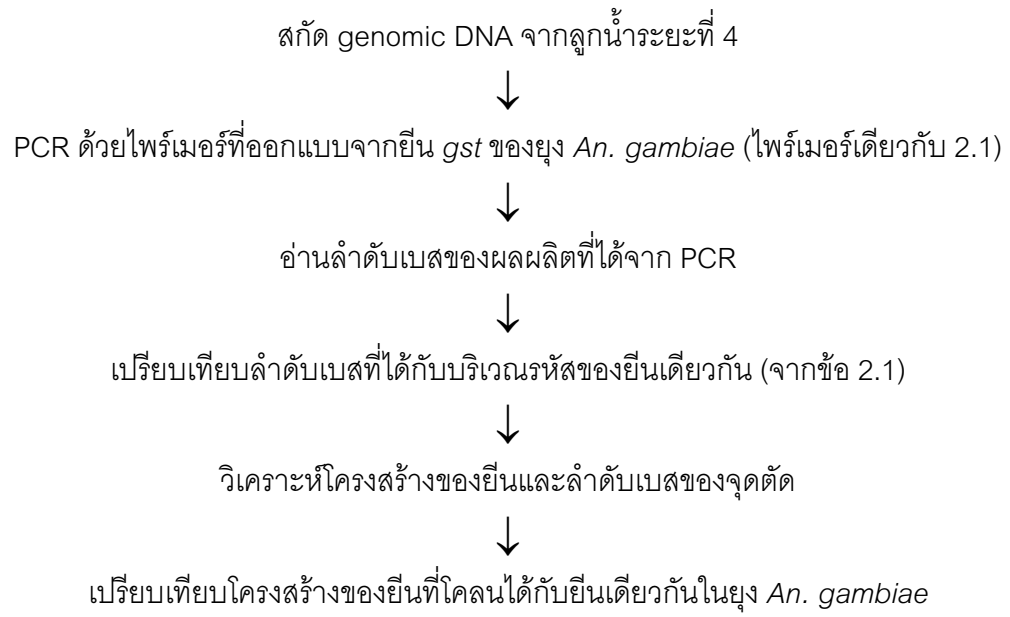


2. การแยกยีน *gst* ใหม่ด้วยเทคนิค PCR

2.1 การแยกบริเวณรหัสของยีน *gst* ใหม่



2.2 การแยกชิ้นจีโนมของยีน *gst* ใหม่



วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยง Plaque จาก genomic DNA library

1. นำเชื้อ *E. coli* XL1 Blue MRA (P2) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB บ่มที่ 37 °C ซ้ำมคืนได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ
 2. นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 15 มิลลิลิตรที่มี 10 mM MgSO₄ และ 0.2% Maltose เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่ 37 °C 3-4 ชั่วโมง อย่าให้ค่า OD₆₆₀ เป็นเกิน 1.0
 3. เก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง 500 xg นาน 10 นาที
 4. ละลายเซลล์กลับมาด้วย 10 mM MgSO₄ ปริมาตรครึ่งของปริมาตรเริ่มต้น จากนั้นเจือจางเซลล์ให้มีค่า OD₆₆₀ เป็น 0.5 ด้วยสารละลาย 10 mM MgSO₄
 5. นำเชื้อที่มีค่า OD₆₆₀ เป็น 0.5 มา 600 µl ใส่สารละลาย phage 5 –10 µl (ผ่านการเจือจางด้วย SM buffer) ที่ให้มีจำนวน plaque 50,000 ต่อจานเลี้ยงเชื้อขนาด 150 mm (ห้ามใช้สารละลาย phage มากกว่า 300 µl ต่อเชื้อ 600 µl)
 6. บ่มเชื้อที่มี phage ที่ 37 °C นาน 15 นาที จากนั้นผสมกับ Top agar (LB ที่มี 0.7% agarose, 10 mM MgSO₄ และ 0.2% Maltose) ปริมาตร 6.5 มิลลิลิตร (หลอมเหลวและปรับให้มีอุณหภูมิ 48 °C)
 7. เทเชื้อจากข้อ 6 ลง Bottom agar (LB ที่มี 0.7% agar) ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 150 mm ทันที ก่อนที่ Top agar จะแข็งตัว จากนั้นเอียงให้ Top agar กระจายบน Bottom agar จนทั่วจานเลี้ยงเชื้อ
 8. บ่มที่ 37 °C 6-8 ชั่วโมง จนเห็น plaque ขนาดประมาณ 1-2 mm เพราะอาจจะมี การรวมกันของ plaque หลายตัว
- (หากใช้จานเลี้ยงเชื้อขนาด 100 mm ให้ใช้เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน 200 µl และ Top agar 3 มิลลิลิตร)

2. การคำนวณ phage titer

1. นำเชื้อ *E. coli* XL1 Blue MRA (P2) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB บ่มที่ 37 °C ซ้ำมคืนได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ
2. นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 15 มิลลิลิตรที่มี 10 mM MgSO₄ และ 0.2% Maltose เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่ 37 °C 3-4 ชั่วโมง อย่าให้ค่า OD₆₆₀ เป็นเกิน 1.0
3. เก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง 500 xg นาน 10 นาที
4. ละลายเซลล์กลับมาด้วย 10 mM MgSO₄ ปริมาตรครึ่งของปริมาตรเริ่มต้น จากนั้นเจือจางเซลล์ให้มีค่า OD₆₆₀ เป็น 0.5 ด้วยสารละลาย 10 mM MgSO₄
5. นำเชื้อที่มีค่า OD₆₆₀ เป็น 0.5 มา 200 µl ใส่สารละลาย phage 1 µl (ที่มีการเจือจางด้วย SM buffer) ต่อจานเลี้ยงเชื้อขนาด 100 mm

6. บ่มเชื้อที่มี phage ที่ 37 °C นาน 15 นาที จากนั้นผสมกับ Top agar (LB ที่มี 0.7% agarose, 10 mM MgSO₄ และ 0.2% Maltose) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (หลอมเหลวและปรับให้มีอุณหภูมิ 48 °C)
7. เทเชื้อจากข้อ 6 ลง Bottom agar (LB ที่มี 0.7% agar) ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 100 mm ทันที ก่อนที่ Top agar จะแข็งตัว จากนั้นเอียงให้ Top agar กระจายบน Bottom agar จนทั่วจานเลี้ยงเชื้อ
8. บ่มที่ 37 °C จนเห็น plaque เกิดขึ้น ประมาณ 8-12 ชั่วโมง
9. นับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณ titer ในหน่วย plaque forming unit/ ml (pfu/ml)

3. การทำ Plaque lift

เป็นการย้าย Plaque จากจานเลี้ยงเชื้อลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

1. เก็บจานอาหารที่มี Plaque ที่ 4 °C 2 ชั่วโมง เพื่อไม่ให้ top agar ติดกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน
2. วางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มี plaque นาน 2 นาที จากนั้นเจาะด้วยเข็มเพื่อป้องกันทิศทางการวาง ทำซ้ำ จะได้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน 2 แผ่นต่อ 1 จาน
3. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน Denaturation Buffer (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) นาน 2 นาที
4. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน Neutralization Buffer (0.5 M Tris-HCl pH 8, 1.5 M NaCl) นาน 5 นาที
5. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน 0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 2X SSC; 3 M NaCl, 0.3 M sodium acetate) นาน 1 นาที
6. วางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนบนกระดาษ Whatman จากนั้นตรึงดีเอ็นเอด้วยการอบที่ 80 °C นาน 1.5-3 ชั่วโมง
7. เก็บจานเลี้ยงเชื้อที่ทำ plaque lift ที่ 4 °C เพื่อใช้ในการคัดเลือกต่อไป ส่วนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนเก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการ hybridization
8. หากมีเพียงแผ่นเดียวถือว่าเป็น False positive signal นำผลบวกจากแผ่นเมมเบรน 2 แผ่นมาเทียบตำแหน่งบนจานเลี้ยงเชื้อ ใช้ปากกาวงไว้

4. การดิงอนุภาค Phage จากอาหารแข็ง

1. เมื่อได้ผลบวกจากการ Hybridization ให้เจาะบริเวณที่มี plaque ที่มี signal ด้วยปลาย tip
2. จากนั้นแช่ไว้ใน SM buffer (0.1 M NaCl, 8 mM MgSO₄ • 7H₂O, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 0.01% gelatin) 1 ml ผสมด้วยการ vortex เก็บที่ 4 °C ให้อนุภาค phage หลุดออกจากก้อน

3. ปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสหลอดใหม่
4. เติมคอลลีโรฟอร์มให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.03% (v/v) สำหรับใช้งาน หากเก็บเป็น stock ต้องใส่ DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 7% (v/v)

5. การสกัดดีเอ็นเอจาก Phage

1. เจาะ Plaque เดียว ให้มีเชื้อรอบๆ ด้วย จากนั้นใส่ลงในอาหาร LB ที่มี 10 mM $MgSO_4$ และ 0.2% Maltose ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
2. เขย่าที่ 37 °C เริ่มต้นเชื้อจะเจริญก่อน เห็นว่าขุ่น เลี้ยงจนเซลล์แตกสังเกตเห็นเซลล์เกาะที่หลอด
3. ปลอຍให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมคอลลีโรฟอร์ม 3 หยด
4. เติมเอนไซม์ DNase I (10 mg/ml) เขย่าต่อประมาณ 20 นาที
5. แบ่งใสหลอด 1.5 ml 2 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
6. ย้ายสารละลายจากข้อ 5 ปริมาตร 0.6 ml ใส่หลอดใหม่แล้วเติม STE (1.5% SDS, 0.3 M Tris-HCl pH 9, 0.15 M EDTA) 0.2 ml
7. ผสมและปั่นที่ 70 °C นาน 15 นาที
8. ปลอຍให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 150 μ l ของ 8 M โพแทสเซียมอะซิเตด ผสมเก็บบนน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 15 นาที
9. ย้ายส่วนใส 700 μ l สกัดด้วย phenol/chloroform 1 ครั้ง ด้วยการเติม phenol/chloroform 700 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex นาน 5 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 นาน 5 นาที
10. เติม 420 μ l ของ isopropanol ผสมแล้วแช่เย็นที่ -80 °C นาน 15 นาที
11. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 นาน 20 นาที ทิ้งส่วนใส
12. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล 2 ครั้ง รอให้แห้ง
13. ละลายดีเอ็นเอกลับด้วย 50 μ l ของ TE buffer ที่มี RNase 0.3 mg/ml ปั่นที่ 37 °C 30 นาที
14. เนื่องจากมี 2 หลอด จึงรวมกันเป็น 100 μ l แล้วเติม 5 M แอมโมเนียมอะซิเตดปริมาตร 40 μ l จากนั้นเติม isopropanol 200 μ l
15. แช่ใน -80 °C 20 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 นาน 20 นาที ทิ้งส่วนใส เก็บส่วนตะกอนดีเอ็นเอ
16. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล 2 ครั้ง รอให้แห้ง
17. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 20 μ l ของ TE buffer เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20 °C จนกว่าใช้งาน

6. Southern blotting

เป็นการย้ายชิ้นดีเอ็นเอจากเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

1. ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)
2. นำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาแยกตามขนาดผ่านตัวกลางที่เป็นเจล โดยใช้หลักการการเคลื่อนที่ตามกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis)
3. นำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะประกบกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แล้ววางลงบนเครื่องย้ายดีเอ็นเอ (VacuGene XL) โดยให้แผ่นเจลอยู่ด้านบน แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนอยู่ด้านล่างแล้วใช้แรงดึงดูดสุญญากาศย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลลงบนแผ่นเมมเบรน โดยมีวิธีการดังนี้
 - เติม Depurination Buffer (0.25 M HCl) บนแผ่นเจล 50 มิลลิลิตร นาน 20 นาที
 - เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 มิลลิลิตร นาน 20 นาที
 - เติม Denaturation Buffer (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) ลงบนแผ่นเจล 50 มิลลิลิตร นาน 20 นาที
 - เติม Neutralization Buffer (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 3 M NaCl) ลงบนแผ่นเจล 50 มิลลิลิตร นาน 20 นาที
 - เติม 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium acetate) ท่วมเจล นาน 120-180 นาที
 - เมื่อครบเวลาแยกแผ่นเมมเบรนออกจากกระดาษกรองและแผ่นเจล
 - แช่แผ่นเมมเบรนใน 20X SSC นาน 10 นาที
 - ประกบแผ่นเมมเบรนด้วยกระดาษซับ 2 แผ่น แล้วอบในตู้อบลมร้อน 70 °C นาน 30 นาที
 - เก็บแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไว้ในถุงพลาสติก

7. การเตรียมดีเอ็นเอตัวติดตาม (Probe)

โดย PCR DIG Probe Synthesis Kit (วิธีการตามคู่มือการใช้ kit) ใช้ cDNA ของยีน *adgst1-5* เป็นแม่พิมพ์ ซึ่งเป็นการติดฉลากดีเอ็นเอด้วยโมเลกุล dUTP-digoxigenin โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *adgst1-5* ของยุง *An. dirus* คือ

adgst1-5F: 5'- CACGCCGCATATGACGACGGTGCTGTACTATC -3'

adgst1-5-1RProbe: 5'- CTGGAATCGTGCCGAGATCGAAGTGACAG - 3'

การควบคุมสภาวะ

pre denature	95 °C	2 นาที	} 35 รอบ
denature	95 °C	30 วินาที	
annealing	50 °C	30 วินาที	
extension	72 °C	1 นาที	
post extension	72 °C	7 นาที	
hold	20 °C	20 นาที	

ในการติดฉลากจะมีการทำ Control ที่ไม่เติม digoxigenin (-DIG) ในขณะที่ probe คือ +DIG เมื่อทำ PCR แล้ว ตรวจสอบการติดฉลากด้วยการ 1% agarose gel electrophoresis หากเป็น -DIG จะมีขนาดประมาณ 300 คู่เบส แต่หากมีการติดฉลากจะต้องเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า เพราะโมเลกุลใหญ่กว่า เนื่องจากมี DIG ถึงแม้ว่าจะมีขนาดเท่ากัน (-DIG กับ +DIG)

8. การทำ Hybridization มีขั้นตอนดังนี้

1. Pre-hybridization

- ใส่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ผ่านการย้ายดีเอ็นเอลงใน hybridization tube
- เติม pre-hybridization buffer (5X SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 1X Blocking Reagent) 20 มิลลิลิตร
- บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 3 ชั่วโมง

2. Hybridization

- เท pre-hybridization buffer เดิมออก
- ใส่ pre-hybridization buffer ใหม่ 20 มิลลิลิตร และ probe ที่ต้มแล้ว 2 ไมโครลิตร
- บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C ซ้ำมคืน

*หมายเหตุ: Probe ได้จากการนำ PCR DIG probe 2 ไมโครลิตรใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วย้ายลงแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 10 นาที

3. Washing

- ล้างด้วย 2X SSC + 0.1% SDS นาน 10 นาที อุณหภูมิห้อง
- ล้างด้วย 2X SSC + 0.1% SDS นาน 30 นาที อุณหภูมิ 50 °C
- ล้างด้วย 0.5X SSC + 0.1% SDS นาน 30 นาที อุณหภูมิ 50 °C ซ้ำ 2 ครั้ง

4. Detection

- ล้างด้วย washing detection buffer (0.1 M Maleic acid ,0.15 M NaCl, 0.3 % (v/v) และ Tween 20) นาน 10 นาที
- เติม 1X Blocking buffer 25 มิลลิลิตร นาน 30 นาที
- ใส่ antibody (anti-digoxigenin-AP, Fab fragments) ในอัตราส่วน 1:10000 blocking buffer 25 มิลลิลิตร นาน 30 นาที
- แช่แผ่นเมมเบรนใน washing detection buffer 50 มิลลิลิตร นาน 30 นาที
- แช่แผ่นเมมเบรนใน detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl pH 9.5) 50 มิลลิลิตร นาน 5 นาที
- นำแผ่นเมมเบรนขึ้นจากบัฟเฟอร์พอลิคลอไรด์ในถังพลาสติก
- ใส่สารตั้งต้น (CSPD 1:100 detection buffer) 1.5 มิลลิลิตร นาน 20 นาที
- ย้ายแผ่นเมมเบรนใส่ในถังพลาสติกแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที

5. การประกบกับแผ่นฟิล์ม X- ray

- ประกบแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายและติดฉลากด้วยตัวติดตามที่มี digoxigenin อยู่กับแผ่นฟิล์ม X-ray นาน 15 นาที
- แช่แผ่นฟิล์มในน้ำยา developer ประมาณ 10 วินาที
- ล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำ
- แช่แผ่นฟิล์มในน้ำยา fixer ประมาณ 10 วินาที
- ล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำ
- ตากแผ่นฟิล์มให้แห้ง

6. การล้างตัวติดตามออกจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

- แช่แผ่นเมมเบรนในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- แช่แผ่นเมมเบรนใน 0.2M NaOH, 0.1% SDS (w/v) นาน 30 นาที 2 ครั้งๆ ละ 50 มิลลิลิตร
- ล้างด้วย 2X SSC นาน 5 นาที
- อบแผ่นเมมเบรนให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 30 นาที
- เก็บไว้ใช้ในการทดลองอื่น ๆ

9. การสกัดดีเอ็นเอของยุงก้นปล้องด้วยสารละลาย DNAzol[®] Reagent

การสกัดดีเอ็นเอ

1. นำลูกน้ำยุง 1 กรัมใส่ลงในโถรงบด จากนั้นเติมไนโตรเจนเหลวลงไป
2. บดตัวอย่างให้ละเอียดจนเป็นผงสีขาว แล้วตักใส่ในหลอดที่มี DNAzol[®] Reagent อยู่ 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที
4. ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม 95% เอทานอล 0.5 มิลลิลิตร / 1 มิลลิลิตร DNAzol[®] Reagent จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยการ Inversion แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง 1-3 นาที ย้ายดีเอ็นเอที่ตกตะกอนใส่ในหลอดใหม่ด้วยการเขี่ยด้วย tip (หากไม่เห็นตะกอนดีเอ็นเอแสดงว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีน้อยเกินไปคือ <15 µg ให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000×g อุณหภูมิ 4 °C นาน 1-2 นาที)
5. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 0.8-1.0 มิลลิลิตร ของ 75% เอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g นาน 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง
6. ละลายดีเอ็นเอด้วย 500 ไมโครลิตรของ 8 mM โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 °C

* **หมายเหตุ:** ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขั้นตอนนี้มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากยังไม่มีทำการกำจัดโปรตีนหรือสีออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (มีสีขาวมากขึ้น)

1. นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดในขั้นตอนมาเติมสารละลาย Phenol (pH 8.0) 1 ปริมาตร (500 ไมโครลิตร) จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g นาน 15 นาที ย้ายส่วนใส (ส่วนน้ำ) ใส่หลอดใหม่
2. เติม Chloroform 1 ปริมาตร (ประมาณ 450 ไมโครลิตร) จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g นาน 15 นาที ย้ายส่วนใส (ส่วนน้ำ) ใส่หลอดใหม่
3. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 1 ปริมาตร (ประมาณ 400 ไมโครลิตร) แล้วแช่ใน -20 °C นาน 15 นาที (หากต้องการให้ดีเอ็นเอตกตะกอนมากขึ้น ให้เติม 1/10 ปริมาตรของ 3 M โซเดียมอะซิเตดลงไปก่อน isopropanol)
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที
5. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1 มิลลิลิตร ของ 75% เอทานอล 2 ครั้ง
6. ตากดีเอ็นเอให้ 75% เอทานอลระเหยพอสมควร หากแห้งเกินไปการละลายกลับมากจะไม่ดี
7. ละลายดีเอ็นเอกลับด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) 20 ไมโครลิตร

10. การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit

1. นำดีเอ็นเอตัวอย่างมาแยกด้วยการทำ Electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel
2. ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยมีดผ่าตัดภายใต้ UV ความยาวคลื่นสูง แล้วใส่ในหลอดใหม่โดยให้มีขนาดเล็กที่สุด
3. ชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดได้แล้วเติมบัฟเฟอร์ QG 3 ปริมาตร ต่อ 1 ปริมาตรของเจล (โดยที่ 100 mg ของเจลประมาณเป็น 100 μ l) น้ำหนักเจลมากที่สุด คือ 400 mg ถ้าน้ำหนักเจลมากกว่า 400 mg ต้องใช้หลอดขนาดใหญ่กว่า 1.5 มิลลิลิตร
4. นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 10 นาที (หรือจนกว่าเจลละลายหมด) ถ้าต้องการให้เจลละลายได้ดีขึ้นให้ผสม (vortex) ทุกๆ 2-3 นาทีขณะบ่ม และถ้าเปอร์เซ็นต์เจลมากกว่า 2% ให้เพิ่มเวลาในการบ่ม
5. หลังจากเจลละลายแล้วให้ตรวจดูสีของสารละลายต้องเป็นสีเหลือง (เหมือนสีของบัฟเฟอร์ QG ที่ไม่มีเจลละลายอยู่) ถ้าสีของสารละลายเป็นสีส้มหรือม่วงให้ทำการเติม 3 M sodium acetate pH 5.0 แล้วผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายกลับเป็นสีเหลือง
(การดูดซับดีเอ็นเอของ QIAquick membrane จะมีประสิทธิภาพดีที่ค่า pH 7.5 ถ้าบัฟเฟอร์ QG มีสีเหลืองค่า pH จะ 7.5 ถ้าเป็นสีม่วงจะมีค่า pH มากกว่า 7.5)
6. (ทางเลือก) เติม 1 ปริมาตร ของ isopropanol แล้วผสมให้เข้ากัน จะทำให้ดีเอ็นเอที่มีขนาดน้อยกว่า 500 คู่เบส และมากกว่า 4 กิโลเบสมากขึ้น (ห้ามปั่นเหวี่ยง)
7. ใส่สารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick column ขนาด 750 ไมโครลิตรที่มี collection tube อยู่
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที ปริมาตรสูงสุดที่ column จุได้คือ 750 ไมโครลิตร ถ้าตัวอย่างมีมากกว่า 750 ไมโครลิตรให้ดูดส่วนใสด้านล่างของ column ออกแล้วเติมตัวอย่างที่เหลือด้านบนจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง
9. ดูดสารละลายที่ไหลผ่าน column ทิ้ง แล้วใส่ QIAquick column ลงใน collection tube ตามเดิม และ collection tube สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้เพื่อลดขยะพลาสติก
10. (ทางเลือก) เติมบัฟเฟอร์ QG 500 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที ในขั้นตอนนี้เป็นที่ย้าย agarose gel ที่หลงเหลือออกหมด
11. เติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที ดูดส่วนใสที่ไหลผ่าน column ทิ้ง (ซ้ำ 2 ครั้ง) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อดึงเอานอลที่เหลือออกจากบัฟเฟอร์ PE ให้หมด ถ้าดีเอ็นเอที่ต้องการจะใช้งานที่มีความไวต่อเกลือ เช่น blunt-end ligation และ direct sequencing ให้ตั้ง column ไว้ 2-5 นาที หลังจากเติมบัฟเฟอร์ PE แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง
12. ย้าย QIAquick column ลงในหลอด microcentrifuge ใหม่

13. สะดึเอ็นเอโดยเติมบัฟเฟอร์ EB 30-50 ไมโครลิตร บริเวณกลางของ QIAquick membrane แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 1 นาที (ซ้ำ 2 ครั้ง) ถ้าต้องการดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นมากให้เติม 30 ไมโครลิตรของบัฟเฟอร์ EB ตรงกลาง membrane และตั้งหลอดทิ้งไว้ 1 นาที
14. เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ 4 °C หรือ -20 °C

11. การสกัดอาร์เอ็นเอจากยุงก้นปล่อง

1. นำลูกน้ำของยุงก้นปล่องมาบดในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผง
2. ตักยุงก้นปล่องที่เป็นผงแล้วใส่ในหลอดสำหรับใช้ปั่นเหวี่ยง (Eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี TRIZOL[®] Reagent 1 มิลลิลิตร (โดยจะต้องตักยุงใส่ไม่เกิน 10% ของสาร TRIZOL[®] Reagent ที่มีในหลอด) แล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้สารผสมกัน จากนั้นนำไป vortex
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส
4. ย้ายส่วนของสารละลายด้านบนไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงใหม่
5. นำสารละลายที่ได้นำไปปั่นที่ 15-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
6. เติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตรต่อ TRIZOL[®] Reagent 1 มิลลิลิตร ที่ใช้ในตอนเริ่มต้น
7. เขย่าหลอดให้สารทั้งสองผสมกันประมาณ 15 วินาที และนำไปปั่นที่ 15-30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 นาที
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารละลายที่แบ่งตัวเป็น 3 ชั้น คือ phenol-chloroform phase, interphase และ aqueous phase ซึ่ง อาร์เอ็นเอจะอยู่ในส่วนสุดท้ายนี้
9. ย้ายส่วนน้ำ (Aqueous phase) ไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่
10. ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยใช้ Isopropyl alcohol 0.5 มิลลิลิตรต่อ 1 มิลลิลิตรของ TRIZOL[®] Reagent ที่ใช้ในตอนเริ่มต้น ผสมลงไปใน aqueous phase ที่ได้ โดยการขยับกรอก
11. นำไปปั่นที่ 15-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
12. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะเห็นตะกอนอาร์เอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายเจลติดอยู่ที่ข้างหลอดปั่นเหวี่ยง
13. ย้ายสารละลายด้านบนออก และล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 มิลลิลิตรของ TRIZOL[®] Reagent ที่ใช้ในตอนเริ่มต้น vortex ให้ตะกอนของอาร์เอ็นเอลอยตัว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 xg อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายส่วนใส่ออกทิ้ง และล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% เอทานอลอีกครั้ง
14. เมื่อล้างตะกอนอาร์เอ็นเอแล้ว ปล่อยให้แห้ง
15. ถ้าตะกอนอาร์เอ็นเอมีสีให้ทำการสกัดสีออกโดยใช้ฟีนอลดังนี้

15.1 ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอใน TE (ที่ใช้น้ำที่ผสม DEPC และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) 200

ไมโครลิตร ปล่อยให้ตะกอนอาร์เอ็นเอละลายให้หมด

15.2 เติมน้ำฟีนอล pH 4 ลงไปในสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 1 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอที่มี

15.3 ผสมสารละลายอาร์เอ็นเอให้เข้ากับฟีนอล แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ฟีนอลแยกชั้น

15.4 ย้ายสารละลายด้านบนไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ แล้วเติมคลอโรฟอร์มลงไป ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอที่มี เขย่าให้สารละลายเข้ากัน

15.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้คลอโรฟอร์มแยกชั้น

15.6 ย้ายสารละลายด้านบนไปใส่ในหลอดใหม่แล้วทำตามข้อ 10-14 อีกครั้ง

16. ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอที่ไม่มีสีแล้วในน้ำปริมาตรตามความเหมาะสม (10-30 ไมโครลิตร)

17. นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่ละลายแล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

18. นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบประสิทธิภาพของอาร์เอ็นเอโดยใช้การทำ 1% agarose gel electrophoresis

12. การสังเคราะห์ cDNA

1. เตรียมปฏิกิริยาดังนี้

Distilled water	9	ไมโครลิตร
Oligo (dT) (500 µg/ml)	1	ไมโครลิตร
10 ng-5 µg total RNA	2	ไมโครลิตร
10 mM dNTP Mix	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรสารละลายทั้งหมด	13	ไมโครลิตร

2. ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง

3. ให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาย้ายไปไว้ในน้ำแข็งทันที

4. นำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นเติม

5X First-Strand Buffer	4	ไมโครลิตร
0.1 M DTT	1	ไมโครลิตร
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/µl)	1	ไมโครลิตร

5. ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง

6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

7. ย้ายมาไว้ในน้ำแข็ง และเติม SuperScript™ III (200 units) 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง

8. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที ต่อกับนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
9. นำ cDNA ที่ได้ไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ต่อไป

13. การทำ PCR

PCR ของ Genomic DNA

ใช้เอนไซม์ HotStartTaq DNA polymerase, 3 mM MgCl₂,

0.5 μM Aggste1-F (5'-TGTCTCCATATGCCGAAACCTGTGCTATAC-3') หรือ

0.5 μM Aggstt1-F (5'-CGCCTCCATATGTCGAAAAATCTAAAATAC-3'),

0.5 μM Adgste1-R (5'-CTATTCATATGTTACGCCTGGCGATTC-3') หรือ

0.5 μM Adgstt1-R (5'-CTCTTTCATATGTTACAATTTGTTCTTTGCGA-3')

และ Genomic DNA/Sau3AI (1 μg) มีการควบคุมสภาวะดังนี้

pre denature	95 °C	15 นาที	} 35 รอบ
denature	95 °C	30 วินาที	
annealing	55 °C	30 วินาที	
extension	72 °C	3 นาที	
post extension	72 °C	7 นาที	
hold	20 °C	20 นาที	

จากนั้นตรวจสอบการเพิ่มจำนวนด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis 100 V 50 นาที

PCR ของ RT

ยีน *adgste1* และ *adgstt1*

ใช้เอนไซม์ Pfx DNA polymerase (เนื่องจากมี proofreading), 2 mM MgSO₄,

0.5 μM Aggste1-F (5'-TGTCTCCCATATGCCGAAACCTGTGCTATAC-3') หรือ

0.5 μM Aggstt1-F (5'-CGCCTCCCATATGTCGAAAAATCTAAAATAC-3'),

0.5 μM Adgste1-R (5'-CTATTCCATAIGTACGCCTGGCGATTC-3') หรือ

0.5 μM Adgstt1-R (5'-CTCTTTCATATGTTACAATTTGTTCTTTGCGA-3') และ cDNA (RT)

มีการควบคุมสภาวะดังนี้

pre denature	94 °C	2 นาที	} 35 รอบ
denature	94 °C	30 วินาที	
annealing	55 °C	30 วินาที	
extension	68 °C	1 นาที	
post extension	68°C	7 นาที	
hold	20 °C	20 นาที	

จากนั้นตรวจสอบการเพิ่มจำนวนด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis 100 V 50 นาที

ยีน *adgsto1*

ใช้เอนไซม์ HotStartTaq DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, 0.5 μM Aggste1-F หรือ 0.5 μM aggst O1-F (5'CAGTTCCCATATGAGCAACGGAAAGCATCT 3'), aggst O1-R (5'CACCTCCCATATGTTACGCCAAGATATCGTAGT3') และ cDNA (RT)

ลำดับเบสตัวหน้าคือ start และ stop codon ส่วนลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณจุดจำของเอนไซม์

Nde I

มีการควบคุมสภาวะดังนี้

pre denature	94 °C	15 นาที	} 35 รอบ
denature	94 °C	30 วินาที	
annealing	50 °C	30 วินาที	
extension	72 °C	2 นาที	
post extension	72°C	7 นาที	
hold	20 °C	20 นาที	

จากนั้นตรวจสอบการเพิ่มจำนวนด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis 100 V 50 นาที

14. การสร้างสายยาว (Contiq)

โปรแกรมที่ใช้ในการสร้าง contiq จากการอ่านลำดับเบส 2 ทิศทาง คือ Bioedit

15. การเปรียบเทียบลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโน

เปรียบเทียบโดยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc

16. การสกัดพลาสมิด (CTAB plasmid DNA miniprep from *E. coli*)

(ที่มา : <http://www.biiinformatics.vg/Methods/miniprepf.htm>) ดัดแปลงมาจากวิธีของ DELSAL G, MANFIOLETTI G และ SCHNEIDER C.

1. นำโคลนของ *E. coli* ที่มี plasmid ที่ต้องการเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม (ในการทดลองใช้แอมพิซิลิน) เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. เก็บเซลล์จากอาหาร 3 มิลลิลิตร โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ เวลา 30 วินาที จากนั้นย้ายส่วนใสด้านบนทิ้ง
3. ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ใน 0.4 มิลลิลิตร STET (8% sucrose w/v, 0.1% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.0) จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
4. เติม 20 ไมโครลิตรของเอนไซม์ไลโซไซม์ (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นขยับกรอกเบา ๆ ให้สารเข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หรือจนกระทั่งความหนืดเพิ่ม แต่ไม่เกิน 10 นาที
5. นำสารละลายไปต้ม เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ทิ้งที่เป็นเวลา 15 นาที
6. ย้ายตะกอน (pellet) สีขาวออกทิ้งโดยใช้ไม้จิ้มฟัน
7. เติม 20 ไมโครลิตรของ 5% CTAB ลงในสารละลาย จากนั้นขยับกรอกให้สารเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
8. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายด้านบนทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอที่อยู่ด้านล่างของหลอดไว้
9. ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน 500 ไมโครลิตร ของ 1.2 M NaCl เติม 1 ไมโครลิตร ของเอนไซม์ RNase A (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าดีเอ็นเอจะละลายหมด
10. เมื่อดีเอ็นเอละลายหมดแล้วจึงเติม 500 ไมโครลิตรคลอโรฟอร์ม และผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
11. ย้ายสารละลายส่วนบน (ส่วนน้ำ) ไปใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ ส่วนสารด้านล่าง (คือคลอโรฟอร์ม) ให้ทิ้งไป
12. เติม 3 M โซเดียมอะซิเตท ปริมาตร 1/10 ของสารละลายทั้งหมด จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน
13. เติม 95% เอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่มี จากนั้นผสมให้สารละลายทั้งหมด โดยการขยับกรอก แล้วนำไปแช่เย็นที่ 0 หรือ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
14. นำสารละลายที่ผ่านการแช่เย็นแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
15. ทิ้งสารละลายใสด้านบนและเก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้

16. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที
เอา 70% เอทานอลออกให้หมด ทำ 2 ครั้ง
17. ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง
18. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.00 หรือ น้ำ ปริมาตรแล้วแต่ความเหมาะสม
(30-50 ไมโครลิตร)

17. การเตรียม Competent cell ตามวิธีของ Inoue และคณะ

1. เลี้ยงเชื้อที่ต้องการนำมาทำ Competent cell ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบเหลวที่เติมยาปฏิชีวนะตามชนิดของเซลล์ที่ต้องการในการทดลองใช้ *E. coli* DH5 α ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะปริมาณ 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เชย้าที่ 200-250 รอบต่อนาที เลี้ยงเซลล์จนมีได้ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6
2. นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปปั่นในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
3. เก็บเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 xg (3,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วดูดส่วนใส่ออกทิ้ง
4. เติมน้ำละลาย TB ที่แช่เย็น 80 มิลลิลิตรลงไป และนำไปปั่นในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์และดูดส่วนใส่ออกทิ้ง
5. ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย TB 20 มิลลิลิตร และเติม DMSO โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 7% เชย้าเบา ๆ ให้สารและเซลล์ผสมให้เข้ากัน
6. นำไปปั่นบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
7. เซลล์ที่ได้แบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่เย็นไว้ หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยแช่ในไนโตรเจนเหลว
8. เก็บเซลล์ที่แช่แล้วไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

การเตรียม TB buffer (Transformation buffer) ตามวิธีของ Inoue และคณะ

1. คำนวณและชั่งสารเพื่อให้มีความเข้มข้นเป็น 10 mM Hepes(หรือ Pipes), 15 mM CaCl₂ และ 250 mM KCl
2. ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน
3. ปรับ pH ให้เป็น 6.7 ด้วย KOH
4. ละลาย MnCl₂ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายใน TB เป็น 55 mM
5. ทำให้ปลอดเชื้อโดยนำสารละลาย TB ไปผ่านตัวกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร
6. เก็บสารละลาย TB ที่ผ่านการกรองแล้วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* (transformation) ตามวิธีของ Inoue และคณะ

1. ละลาย Competent cell ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละหลอดมีเซลล์ 200 ไมโครลิตรในน้ำแข็ง
2. เติมพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณ 1-5 ไมโครลิตรลงใน competent cell ที่อยู่ในหลอด แล้วนำไปปั่นในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
3. Heat shock เซลล์ที่ 42 องศาเซลเซียส (สามารถใช้อุณหภูมิสูงสุดได้ที่ 52 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วินาที และย้ายไปปั่นในน้ำแข็งทันที
4. เติมอาหารเหลว LB ลงไป 800 ไมโครลิตร และนำไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. นำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะตามที่ต้องการ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

18. วิธีการคัดเลือกรวดตามขนาดของพลาสมิด (Rapid size screening)

1. นำเซลล์ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 1 คืน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ไว้
2. เติม 50 ไมโครลิตรของ Lysis buffer (Lysis buffer; 5 mM EDTA, 10% (w/v) sucrose, 0.25% (w/v) SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05% (w/v) bromophenol blue) ผสมให้เข้ากัน
3. นำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
4. เมื่อครบเวลาย้ายไปปั่นในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที
6. ดูดเฉพาะสารด้านบนมา 20 ไมโครลิตรเป็นสารตัวอย่างในการทำ 1% agarose gel Electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

19. การแสดงออกของดีเอ็นเอสายผสม

1. เลี้ยง *E. coli* BL21(DE3)pLysS ที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการอยู่ในอาหาร LB broth ที่มี ampicillin 100 µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml ปริมาตร 3 ml ที่ 37°C ข้ามคืน
2. ใช้เชื้อจากข้อ 1 เป็นเชื้อเริ่มต้น โดยใช้ 1% ของปริมาตรอาหาร (หากต้องการแสดงออก 200 ml ต้องใช้เชื้อเริ่มต้น 2 ml) อาหารที่ใช้ คือ LB broth ที่มี ampicillin 100 µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml เขย่าที่ 37°C จนค่า OD₆₀₀ ถึง 0.6
3. ชักนำให้มีการแสดงออกด้วยการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 mM เขย่าต่อ 3 ชั่วโมง
4. จากนั้นแช่ขวดหมึกจากข้อ 5 ในน้ำแข็ง 20 นาที
5. เทใส่ขวดสำหรับปั่นเหวี่ยง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่ 4°C

6. เก็บและละลายตะกอนของเซลล์ในอาหาร LB 10 ml
7. ย้ายใส่หลอดปั่นเหวี่ยง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่ 4°C
8. เก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่ -20°C จนกว่าใช้งาน

20. การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์

การเตรียม cell lysate

1. ตะกอนเซลล์ที่ได้จากการชักนำ 200 ml ละลายกลับใน 19.2 ml ของ phosphate buffer pH 7.3 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 pH 7.3), 800 μl ของ เอนไซม์ lysozyme (100 mg/ml), 14.4 μl ของ 1.4 M mercaptoethanol และ 200 μl ของ 1 M DTT
2. ผสมจากนั้นแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที
3. ทำให้เซลล์แตกโดย French press ที่ 1000 psi
4. นำเซลล์ที่แตกไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C 20 นาที
5. เก็บส่วนใสไว้ในน้ำแข็งสำหรับใช้ใน Affinity chromatography

การแยกบริสุทธิ์ด้วย GSTrap affinity chromatography

เอนไซม์ GST ที่ละลายน้ำในส่วน supernatant ถูกแยกบริสุทธิ์ออกจากโปรตีนอื่นๆ ด้วย GSTrap affinity chromatography ซึ่งวิธีใช้ตามคู่มือ วิธีสังเขป (ทุกขั้นตอนทำที่ 4°C) ได้แก่

1. ฉีด GSTrap column ด้วย PBS pH 7.3 (binding buffer) ปริมาตร 5 เท่าของ column (5 bed volumes)
2. ฉีดส่วนใสจากการเตรียม cell lysate ปริมาตร 10 ml ด้วยอัตรา 1 ml/min จากนั้นพัก column ไว้ 10 นาที หากมีส่วนใสเหลืออยู่ก็ฉีดต่อไป ขณะเดียวกันเก็บ flowthrough เพื่อวิเคราะห์ว่าเอนไซม์จับกับ column ได้หรือไม่
3. ล้าง GSTrap column ด้วย PBS pH 7.3 ปริมาตร 35 ml ด้วยอัตรา 5 ml/min เพื่อชะโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการออกจาก column
4. ชะโปรตีนที่ต้องการด้วย elution buffer (10 mM GSH in 1.5 M Tris-HCl pH 8.0, and 10 mM DTT) 40 ml ด้วยอัตรา 5 ml/min เก็บส่วนที่ชะออกมาเป็นส่วนๆ ละ 10 ml จึงได้ทั้งหมด 4 fraction
5. นำแต่ละ fraction ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ (การเชื่อม GSH กับ CDNB) แล้วรวม fraction ที่มีเอนไซม์เข้าด้วยกัน
6. นำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการใส่ใน centrprep-10 (Amicon) จากนั้นปั่นเหวี่ยง 2500 xg ที่ 4°C จนกว่าปริมาตรจะเหลือน้อยกว่า 1.5 ml

7. ฉีดตัวอย่างใน HiTrap desalting column ที่ผ่านการฉีดด้วย 50 mM phosphate buffer pH 6.5 ปริมาตร 5 เท่าของ column (25 ml) ด้วยอัตรา 5 ml/min เพื่อกำจัด GSH ออกด้วย
8. ฉะเอนไซม์ออกจาก HiTrap desalting column ด้วย 50 mM phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 10 mM DTT ปริมาตร 2 ml
9. ทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นด้วยใสใน centrprep-10 (Amicon) จากนั้นปั่นเหวี่ยง 2500 xg ที่ 4 °C จนกว่าปริมาตรจะเหลือน้อยกว่า 1ml
10. เติม glycerol ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50%
11. เก็บเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้ที่ -20 °C
12. ล้าง GSTrap column ด้วย PBS 10 ml ตามด้วย 6 M guanidine hydrochloride 20 ml และ PBS 50 ml ส่วน HiTrap desalting column ล้างด้วย 50 mM phosphate buffer pH 6.5 25 ml เก็บ column ไว้ที่ 4°C

การแยกบริสุทธิ์ด้วย HITRAP® SP XL column และ HITRAP® PHENYL SEPHAROSE column

โดย HITRAP® SP XL column เป็น cationic exchanger ส่วน HITRAP® PHENYL SEPHAROSE column เป็น hydrophobic chromatography ซึ่งวิธีใช้ตามคู่มือ วิธีสังเขป (ทุกขั้นตอนทำที่ 4°C) ได้แก่

1. หลังจากชักนำการแสดงออก เตรียม cell lysate เก็บส่วนใสในน้ำแข็งสำหรับการแยกบริสุทธิ์
2. ฉีด HITRAP® SP XL column ด้วย Start buffer (50 mM PO_4 , pH 7) ที่ 5 ml/min ปริมาตร 10 เท่าของ column
3. เก็บส่วน flow-through
4. ล้าง column ด้วย 50 mM PO_4 , pH 7 ปริมาตร 5 เท่าของ column
5. ฉะโปรตีนด้วย 15 ml ของ 50 mM PO_4 , pH 7 + 150 mM NaCl
6. ฉะโปรตีนด้วย 15 ml ของ 50 mM PO_4 , pH 7 + 250 mM NaCl
7. ฉะโปรตีนด้วย 15 ml ของ 50 mM PO_4 , pH 7 + 500 mM NaCl
8. นำโปรตีนที่ชะได้ 3 ส่วน (Fraction) ไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ว่ามีโปรตีน GST ที่ต้องการที่ fraction ไດ ปกติมักได้ที่ 250 mM NaCl
9. นำ fraction ที่มีโปรตีน GST แยกต่อด้วย HITRAP® PHENYL SEPHAROSE column
10. ฉีด HITRAP® PHENYL SEPHAROSE column ด้วย 50 mM PO_4 , pH 7 + 2M NaCl
11. ฉีดโปรตีนจากข้อ 9 ที่เติม NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 M ด้วยอัตราไหล 5 ml/min
12. เก็บ flow-through

13. ล้าง column ด้วย 20 ml ของ 50 mM PO₄, pH 7 + 150 mM NaCl ตามด้วย 20 ml ของ 50 mM PO₄, pH 7
14. ชะโปรตีนด้วย 15 ml ของ 20% Ethylene glycol
15. ล้าง HITRAP[®] SP XL column ด้วย 50 mM PO₄, pH 7 + 1 M NaCl ปริมาตร 5 เท่าของ column ตามด้วย 50 mM PO₄, pH 7 ปริมาตร 10 เท่าของ column ส่วน HITRAP[®] PHENYL SEPHAROSE column ล้างด้วย น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 25 ml เก็บ column ไว้ที่ 4°C

21. การวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์

ด้วยการทำ Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE)

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของ Separating Gel และ Stacking Gel

	Separating Gel	Stacking Gel
Monomer Concentration	12 %	4.0 %
Acrylamide/bis	4.00 ml	0.65 ml
Distilled water	3.35 ml	3.05 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.50 ml	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	1.25 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	50 µl
10 % ammonium persulfate	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Total monomer	10 ml	5 ml

การเตรียม 5x electrode (Running) buffer, pH 8.3 ประกอบด้วย

Tris base	15	กรัม/ลิตร
Glycine	72	กรัม/ลิตร
SDS	5	กรัม/ลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันตามลำดับปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

วิธีการทำ SDS-PAGE

1. เท Separating Gel ที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว (ตารางที่ 2.1) ลงในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ซึ่งแผ่นกระจกจะต้องเช็ดให้สะอาดด้วย 95% เอทานอล จากนั้นปรับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่น เมื่อ

Separating Gel แข็งตัวให้เทน้ำกลั่นที่ผิวหน้าทิ้ง จากนั้นเท Stacking Gel ทับด้านบนเลยบหวีลง
ไป

2. เมื่อ Stacking Gel แข็งตัว จึงใช้น้ำกลั่นฉีดไล่เศษเจลในหลุมที่ใส่ตัวอย่าง จากนั้นแกะแผ่นกระจก
ออกมาประกอบเข้ากับชุดทำ SDS-PAGE
3. ใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วลงในหลุม โดยใช้ปริมาณตัวอย่างตามความเหมาะสม
4. ทำการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลา จึงแกะเจลออกจากแผ่นกระจก
6. นำเจลไปย้อมในสีย้อมซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ 0.25 กรัม ของ Coomassie Brilliant Blue R-250 ต่อ
100 มิลลิลิตรของเมทานอล เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลมาล้างสีย้อมออกจนกว่าแผ่นเจลจะ
ใสและเห็นแถบโปรตีนชัดเจน
7. นำเจลไปทำให้แห้ง

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

1. เก็บเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21pLysS ที่มีดีเอ็นเอสายผสม ซึ่งมีความขุ่น 1 OD
2. เติม 5x sample buffer ลงไปในเซลล์ตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
3. นำตัวอย่างไปต้มเป็นเวลา 30 วินาที
4. นำไปปั่นเหวี่ยงทันที ที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที
5. นำสารตัวอย่างด้านบน 5 ไมโครลิตร ไปใส่ในช่องเจลที่เตรียมไว้

22. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิธีของ Bradford ใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน สารที่ใช้ในการ
วิเคราะห์ คือ Biorad protein reagent (Bio-Rad) ที่เจือจาง 4 เท่าด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและกรองด้วยกระดาษ
Whatman No.1 วิธีการ คือ

1. ผสม Biorad protein reagent 300 μ l กับ โปรตีนตัวอย่าง 10 μ l ใน microtiter plate
2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm
4. สร้าง Protein standard curve จาก BSA ความเข้มข้นต่างกัน 7 ค่า (0-0.6 mg/ml)
5. จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างจากสมการที่ได้จาก Protein standard
curve

23. การศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GST (GST activity)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GST ด้วยการติดตามการเชื่อมกันระหว่าง glutathione (30 mM) กับ CDNB (1mM) ที่ความยาวคลื่น 340 nm ใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 ที่ 25°C

1. เตรียมสารตั้งต้นด้วยการผสม 25 μ l ของ 42 mM CDNB (ใน absolute ethanol) กับ 450 μ l ของ 21 mM GSH (ใน 0.1 M phosphate buffer) กับ 25 μ l ของ 0.1 M phosphate buffer pH 6.5
2. เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติม 100 μ l ของ 0.1 M phosphate buffer และ 10 μ l ของเอนไซม์ GST ที่เจือจางแล้วในหลุม microtiter plate
3. เติมสารตั้งต้นที่เตรียมไว้ (ข้อ 1) 100 μ l ทันที
4. อัตราการเชื่อมของ GSH และ CDNB วัดด้วยการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm นาน 1 นาที

การวิเคราะห์ Substrate Specificities

Specific activity ต่อสารตั้งต้นต่างๆ คือ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB), p-nitrophenethyl bromide (PNPB), p-nitrobenzyl chloride (PNBC) และ ethacrynic acid (EA) โดยเตรียม GSH stock ใน 0.1 M phosphate buffer ที่ค่า pH ที่เหมาะสมกับสารตั้งต้นแต่ละชนิด (ตารางที่ 2.2) ส่วนสารตั้งต้น (มักเป็น hydrophobic substrate) เตรียมด้วยการละลายใน absolute ethanol และเจือจางด้วย 0.1 M phosphate buffer (assay buffer) การวิเคราะห์จะทำที่อุณหภูมิ 25-27°C ใน 0.1 M phosphate buffer การคำนวณ Specific activity ของสารตั้งต้นแต่ละชนิดจะใช้ค่า Absorbance coefficient ของสารตั้งต้นแต่ละชนิด (ตารางที่ 2.2) และรายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation จากการทดลอง 3 ครั้งที่มีอิสระ

การวิเคราะห์ Kinetic Parameter ต่างๆ

วิเคราะห์ Kinetic Parameter จากความเร็วของปฏิกิริยาเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของ CDNB จาก 0.02-3 mM ส่วน GSH ให้มีความเข้มข้นคงที่ (30 mM) โดยปฏิกิริยาทำใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ GSH จาก 1.25- 40 mM ส่วน CDNB ให้มีความเข้มข้นคงที่ (1 mM) ค่า maximal velocity (V_{max}) และค่า Michaelis constant (K_m) วิเคราะห์จาก non-linear regression โดยโปรแกรม GraphPad Prism ส่วนค่า catalytic constant (k_{cat}) คำนวณจากสมการ $K_{cat} = (V_{max} \times \text{molecular weight} \times 1/60000)/\text{sec}$ ค่าคงที่ต่างๆ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation จากการทดลอง 3 ครั้งที่มีอิสระ

ตารางที่ 2.2 ค่าต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ Specific activity ของสารตั้งต้นแต่ละชนิด

Substrates	Concentration (mM)	pH buffer	λ_{max} (nm)	Absorbance coefficient ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
CDNB	1	6.5	340	9.6
DCNB	1	7.5	345	8.5
EA	0.2	6.5	270	5.0
PNBC	0.1	6.5	310	1.2
PNPB	0.1	6.5	310	1.9

การวิเคราะห์ Stability (Stability Assay)

1. ปั่นเอนไซม์ความเข้มข้นสุดท้าย (0.1 mg/ml) ใน 0.1 M phosphate buffer ที่มี 1 mM EDTA และ 5 mM DTT ที่อุณหภูมิ 45 °C
2. นำบางส่วนมาวัดกิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์ โดยวัดที่ 3 เวลา จนกว่าค่า activity น้อยกว่า 50%
3. คำนวณค่า half-life จากสมการ $\text{Slope} = k/2.3$ โดยที่ $k = 0.693/t_{1/2}$ ค่า slope มาจากกราฟเส้นตรงระหว่าง log ของ % original activity กับเวลาที่ใช้ในการปั่น

ผลการทดลอง

1. Genomic DNA library Screening

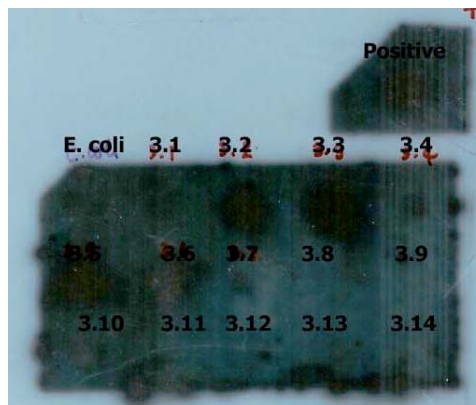
เมื่อขยายขนาดของ Frozen genomic library เพื่อใช้เป็น working stock และติดฉลากชิ้นดีเอ็นเอ ส่วนปลาย 5' ของยีน *adgst1-5* ด้วย Digoxigenin เพื่อใช้เป็น DNA probe จึงคัดเลือกหาโคลนที่มียีน *gst* ใหม่ รอบที่ 1 ด้วยวิธี plaque hybridization แบบ Non-radioisotope probe และตรวจด้วยวิธี chemiluminescence ได้ 42 บริเวณที่น่าจะมี Positive plaque จาก 500,000 plaque

เนื่องจาก plaque จากรอบที่ 1 มีความหนาแน่นมากต้องทำการคัดเลือกทำซ้ำ หากทำด้วยวิธีปกติก็ต้องเพาะเลี้ยง plaque ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 10 เซนติเมตร จำนวน 42 จาน และย้าย plaque DNA ลงสู่แผ่น membrane จำนวน 84 แผ่น จากข้อจำกัดของแผ่น membrane จึงทำการเพาะเลี้ยง phage 42 clone ในอาหารเหลวแล้วทำการสกัด phage DNA เพื่อใช้ในการทำ dot blot hybridization จากทั้งหมด 42 โคลน โดยหยดลงบนเมมเบรน ได้ผลการทดลอง ดังรูปที่ 3.1



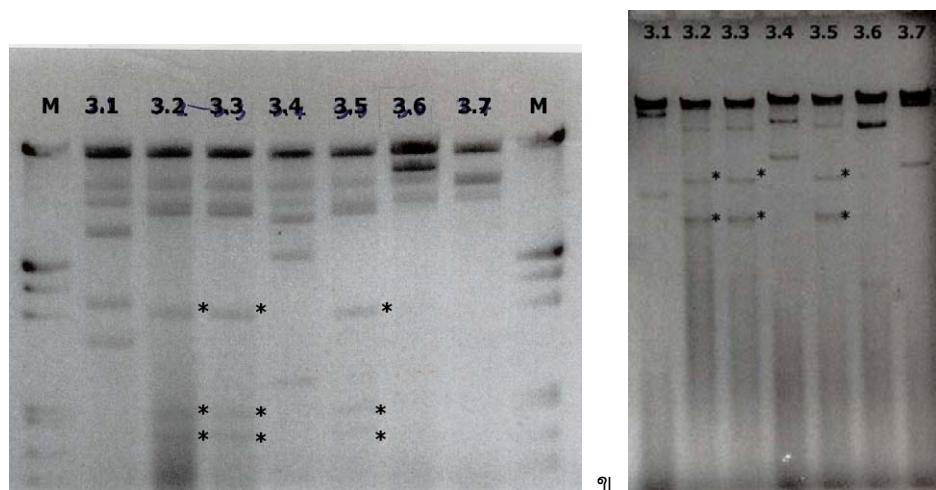
รูปที่ 3.1 ผลการคัดเลือกรอบที่ 2 จาก 42 โคลนได้ผลบวกจากโคลน 2.1

เนื่องจากจาก 42 โคลนที่ได้จากการคัดเลือกรอบที่ 1 นั้นไม่เป็น Single plaque แสดงว่าโคลน 2.1 เป็นโคลนผสม จึงต้องนำ Phage 2.1 stock มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 10 เซนติเมตร แล้วทำ plaque hybridization จนได้ plaque เดี่ยวๆ ที่ให้ positive signal ก่อนแล้วจึงคัดเลือกต่อไป ซึ่งได้จำนวน 14 โคลน หลังจากนั้นเพาะเลี้ยง Single plaque ในอาหารเหลว แล้วนำมาทำ dot blot hybridization ได้ผลบวก 7 clone ได้แก่ clone 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 และ 3.7 ดังรูปที่ 3.2 โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ให้ strong signal (โคลนที่ 3.2, 3.3, 3.5 และ 3.6) กลุ่มที่ให้ weak signal (โคลนที่ 3.1, 3.4 และ 3.7) โดยใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* เป็น negative control ซึ่งไม่พบ signal ใดๆ



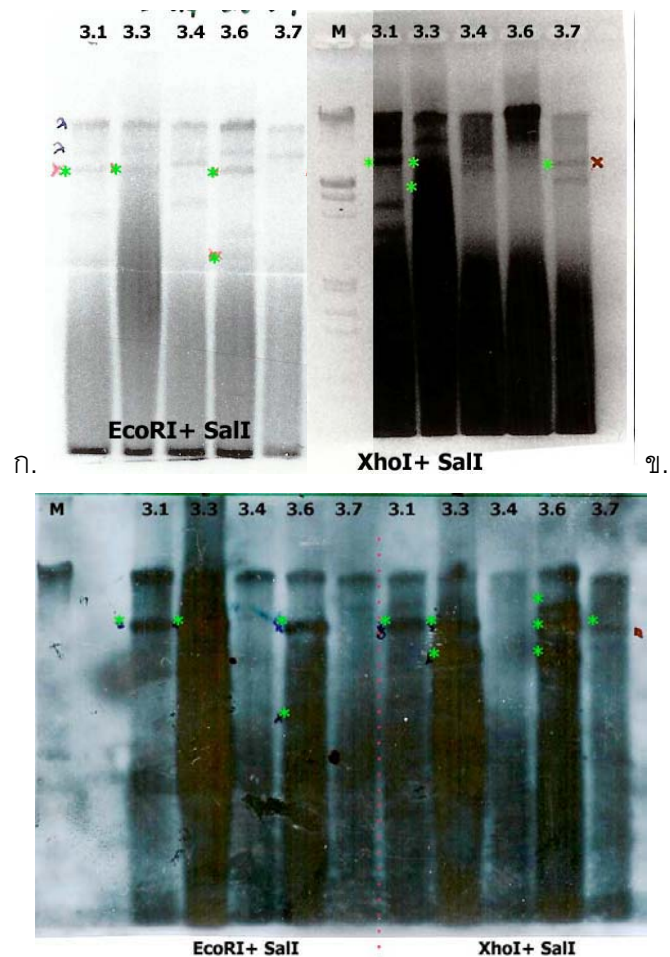
รูปที่ 3.2 ผลการทำ Dot blot hybridization ที่เป็นการคัดเลือกรอบที่ 3 ให้ผลบวก 7 โคลน

จากนั้นนำ Phage DNA ของทั้ง 7 โคลนตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *SalI* เพื่อตรวจสอบว่าทั้ง 7 โคลนเป็นโคลนที่แตกต่างกันหรือไม่ ผลการตัดของทั้ง 2 เอนไซม์จากการทำ 1% agarose gel electrophoresis พบว่าโคลน 3.2, 3.3 และ 3.5 เป็นโคลนเดียวกัน ดังรูปที่ 3.3 จึงสรุปได้ว่าได้ positive clone จำนวน 5 โคลน ได้แก่ โคลน 3.1, 3.3, 3.4, 3.6 และ 3.7



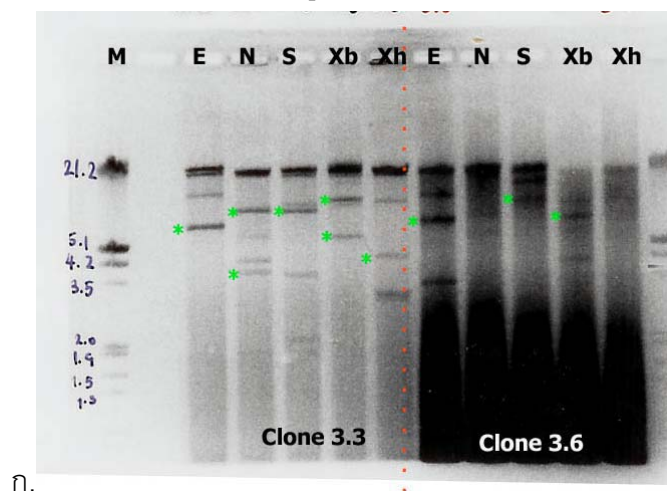
รูปที่ 3.3 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ก. Phage DNA ตัดด้วย *SalI* ข. Phage DNA ตัดด้วย *EcoRI* โดยที่ M คือ *Lambda/HindIII* ส่วนขึ้นที่ * ไว้แสดงขึ้นที่เหมือนกัน

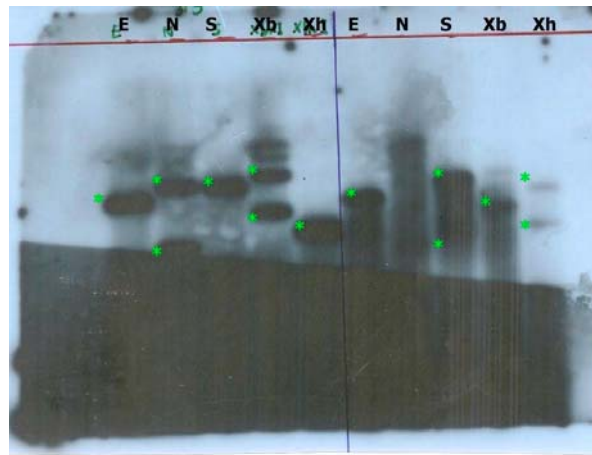
จากนั้นนำ Phage DNA ของทั้ง 5 โคลนมาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*+ *SalI* และ *XhoI*+ *SalI* การใช้เอนไซม์ 2 เอนไซม์ตัดในเวลาเดียวกันเพื่อตัดขึ้น genomic DNA ของยุงออกจาก λ arm (vector) เมื่อทำ Southern hybridization ได้ผลดังรูปที่ 3.4 ที่แสดงโคลน 3.4 ไม่ได้ผลบวก ส่วนโคลน 3.7 ให้ผลบวกน้อย (เป็นโคลนที่น่าสนใจ) ส่วนโคลน 3.3 และ 3.6 น่าจะเป็นโคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอ overlap กัน เนื่องจากมี positive band บางส่วนเหมือนกัน



รูปที่ 3.4 การทำ Southern hybridization ของโคลน 3.1, 3.3, 3.4, 3.6 และ 3.7 ก. การทำ 1% agarose gel electrophoresis ของ phage DNA ที่ตัดด้วย *EcoRI*+ *SalI* และ *XhoI*+ *SalI* ตามลำดับ ข. फिल्म x-ray ขึ้นที่ * แสดงว่าได้ผลบวกจากฟิล์ม x-ray

นำ Phage DNA ของโคลน 3.3 และ 3.6 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *NdeI*, *SalI*, *XbaI* และ *XhoI* เมื่อนำ มาทำ Southern hybridization ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.5





ข.

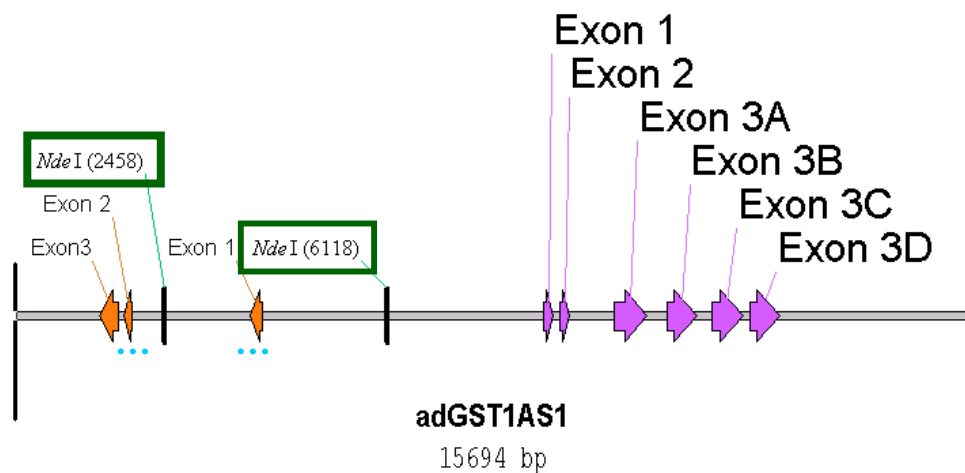
Clone 3.3

Clone 3.6

รูปที่ 3.5 การทำ Southern hybridization ของโคลน 3.3 และ 3.6 ก. การทำ 1% agarose gel electrophoresis ของ phage DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (E), *NdeI* (N), *SalI* (S), *XbaI* (Xb) และ *XhoI* (Xh) ข. फिल्म x-ray ขึ้นที่ * แสดงว่าได้ผลบวกจากฟิล์ม x-ray

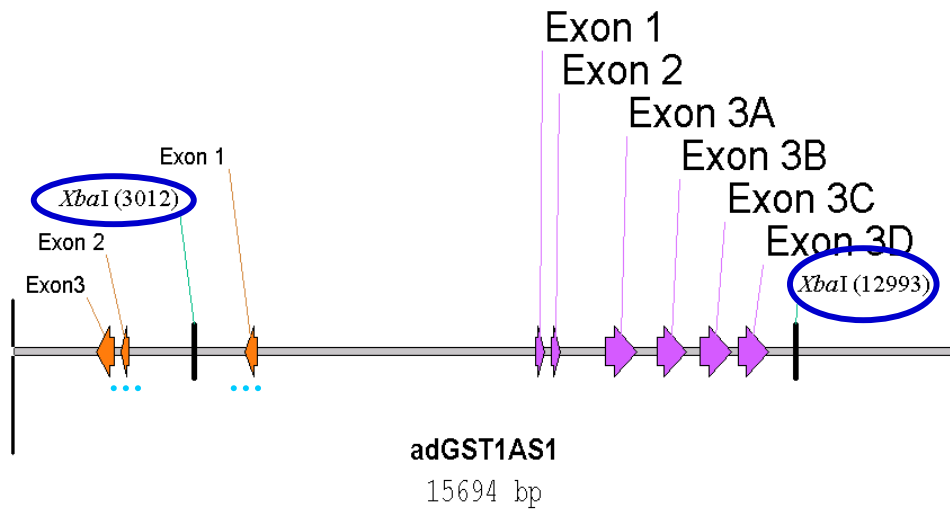
จากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ได้ผลบวกจากชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 6 กิโลเบส เอนไซม์ *NdeI* ได้ผลบวกจากชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.6 และประมาณ 7 กิโลเบส เอนไซม์ *SalI* ได้ผลบวกจากชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 8 กิโลเบส เอนไซม์ *XbaI* ได้ผลบวกจากชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10 กิโลเบส ส่วนเอนไซม์ *XhoI* ได้ผลบวกจากชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4.3 กิโลเบส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของโคลนที่เคยแยกได้ก่อนหน้านี้ คือ *adgstIASI* (รูปที่ 3.6-3.8) พบว่าเป็นโคลน 3.3 เป็นชิ้นที่มียีน *adgst1AS1* และ *adgst5-1* ที่เคยแยกสกัดได้มาก่อนหน้า และโคลน 3.6 มีชิ้น *adgstIASI* ด้วยเช่นกันเนื่องจากเป็น overlapping clone กับโคลน 3.3

จึงเหลือโคลนที่น่าสนใจ 3 โคลนได้แก่ โคลน 3.1, 3.4 และ 3.7 แต่เนื่องจาก Digoxigenin Detection kit หมดซึ่งมีราคาแพง ในการทดลองใช้ระยะเวลานาน และวิธีการนี้มีโอกาสจะได้โคลนเดิมที่มีอยู่ก่อนแล้ว จึงหยุดการแยกยีนด้วยวิธีนี้



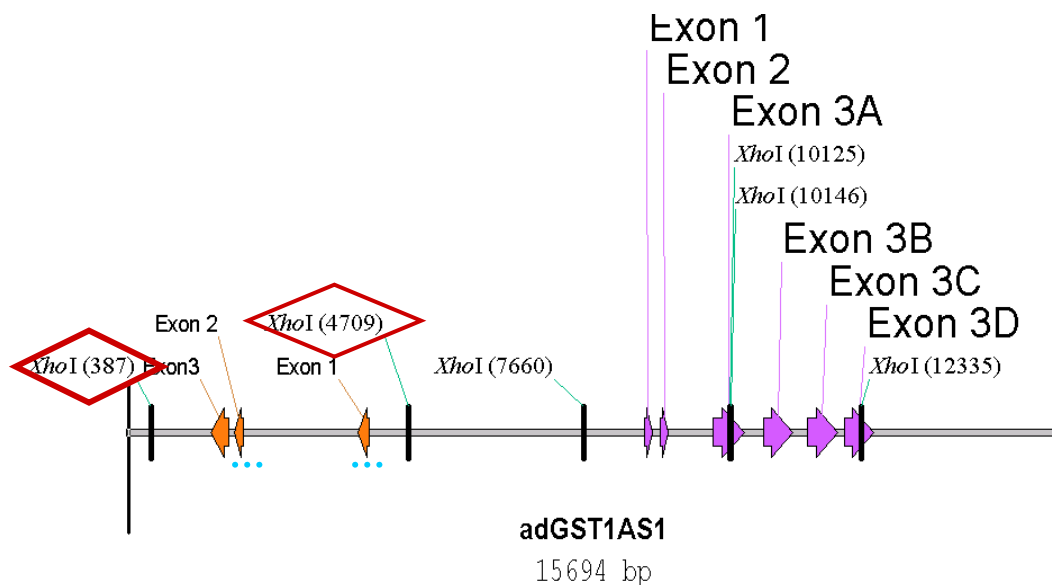
รูปที่ 3.6 การตัด *adgstIASI* ด้วย *NdeI* (แสดงกล่องสีเขียว) ส่วนบริเวณที่ DNA probe จับแสดงด้วยเส้นปะสีฟ้า

ผลที่คาดว่าจะได้จากการทำ Southern hybridization คือ ผลบวกจากชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.6 กิโลเบส (6118-2458)



รูปที่ 3.7 การตัด *adgst1AS1* ด้วย *Xba*I (แสดงในวงรีสีน้ำเงิน) ส่วนบริเวณที่ DNA probe จับแสดงด้วยเส้นปะสีฟ้า

ผลที่คาดว่าจะได้จากการทำ Southern hybridization คือ ผลบวกจากชิ้นดีเอ็นเอขนาด 9.9 กิโลเบส (12993-3012)



รูปที่ 3.8 การตัด *adgst1AS1* ด้วย *Xho*I (แสดงในกล่องสีแดง) ส่วนบริเวณที่ DNA probe จับแสดงด้วยเส้นปะสีฟ้า

ผลที่คาดว่าจะได้จากการทำ Southern hybridization คือ ผลบวกจากชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.3 กิโลเบส (4709-387)

2. การแยกยีน *gst* ใหม่ด้วยเทคนิค PCR

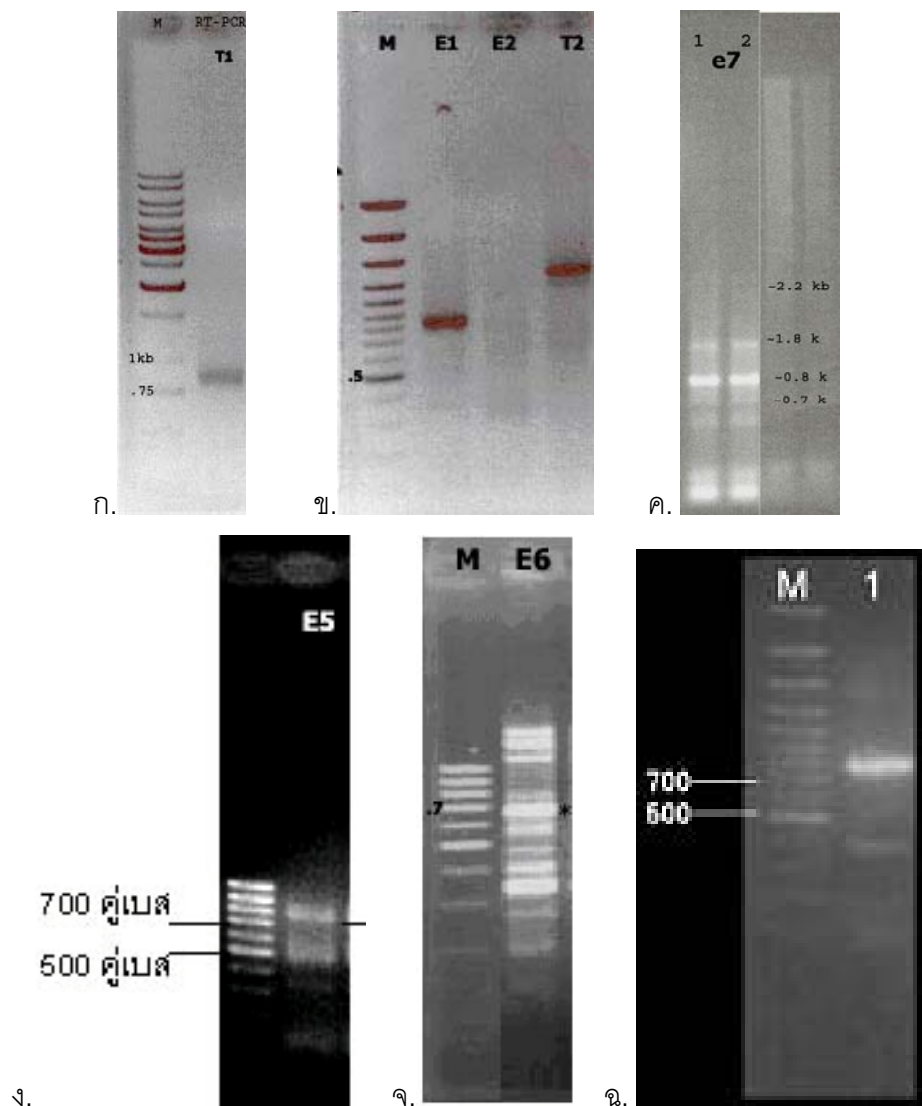
เนื่องจากในปี 2546 ได้มีการรายงานการอ่านจีโนมของยุงพาหะมาเลเรียของทวีปอาฟริกา (*An. gambiae*) และได้คาดเดาว่าจะมียีน *gst* ทั้งหมดในจีโนม 28 ยีน จึงเปลี่ยนวิธีการมาใช้เทคนิค PCR เนื่องจาก

รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย และจากงานก่อนหน้าที่มักพบยีน *gst* ที่เหมือนกันในยุงทั้ง 2 (*An. dirus* และ *An. gambiae*) จึงเป็นได้ว่าจะพบยีน *gst* เดียวกันจากยุง *An. dirus*

2.1 การแยกบริเวณรหัสของยีน *gst* กลุ่มแอฟซิลอน (epsilon) กลุ่มทีต้า (theta) และกลุ่มโอเมก้า (omega) จากยุง *An. dirus*

2.1.1 การทำ RT-PCR

จากจีโนมของยุง *An. gambiae* ออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *gst* epsilon1 (*gstε1*), epsilon5 (*gstε5*), epsilon6 (*gstε6*), epsilon 7 (*gstε7*; *gst3-8*), theta1 (*gstθ1*), theta2 (*gstθ2*) และ omega1 (*gstω1*) โดยไพรเมอร์ออกแบบจากบริเวณรหัสของยีนเท่านั้นและได้ใส่บริเวณจดจำของเอนไซม์ *NdeI* เพื่อใช้ในการโคลนใส่ดีเอ็นเอพาหะ pET 3a (expression vector) ใช้ในการทำ RT-PCR ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 การทำ 1% agarose gel electrophoresis ของ RT-PCR ก. ไพรเมอร์ *gstt1* (T1) ข. ไพรเมอร์ *gste1* (E1), *gste2* (E2) และ *gstt2* (T2) ค. ไพรเมอร์ *gste7* (e7) ง. ไพรเมอร์ *gste5* (E5) จ. ไพรเมอร์ *gste6* ฉ. ไพรเมอร์ *gstω1*

จากนั้นสกัดบริสุทธิ์จากเจลด้วย Ququick Gel extraction kit (QUIGEN) เพื่ออ่านลำดับเบส ปกติ ยีน *gst* มักมีขนาดประมาณ 600-700 คู่เบส ดังนั้นจากไพรเมอร์ *gst*₇ ขนาดที่ส่งไปอ่านลำดับเบสคือขึ้น ประมาณ 800 คู่เบส เมื่อนำผลการอ่านเปรียบเทียบกับลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนต่างๆในฐานข้อมูล ไม่พบว่าเหมือนหรือคล้ายกับยีน *gst* ใดๆ เลย ดังรูปที่ 3.10

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
gi 29420831 dbj BAC66637.1	apyrase [Glycine max]	<u>31</u>	6.0
gi 27260922 dbj BAC45033.1	apyrase [Pisum sativum] >gi 294...	<u>31</u>	6.0
gi 19909915 dbj BAB87182.1	apyrase [Pisum sativum]	<u>31</u>	6.0
gi 11596073 dbj BAB18890.1	apyrase S-type [Pisum sativum] ...	<u>31</u>	6.0
gi 1709358 sp P52914 NTPA_PEA	Nucleoside-triphosphatase (Nu...	<u>31</u>	6.0
gi 6683666 dbj BAA89275.1	apyrase [Pisum sativum]	<u>31</u>	6.0
gi 19909946 dbj BAB87197.1	ATP diphosphohydrolase [Pisum s...	<u>31</u>	6.0
gi 11602478 dbj BAB18892.1	apyrase [Pisum sativum]	<u>31</u>	6.0
gi 19909948 dbj BAB87198.1	ATP diphosphohydrolase [Pisum s...	<u>31</u>	6.0
gi 13488669 dbj BAB40231.1	S-type apyrase [Pisum sativum]	<u>31</u>	6.0

รูปที่ 3.10 ผลของการทำ BlastX ของลำดับเบสของผลผลิตจากไพรเมอร์ *gst*₇ ขนาด 800 คู่เบส

ผลผลิตจากไพรเมอร์ *gst*₅ และ *gst*₆ ขึ้นประมาณ 700 คู่เบส เมื่อนำผลการอ่านเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนต่างๆในฐานข้อมูล ไม่พบว่าเหมือนหรือคล้ายกับยีน GST ใดๆ เลย ดังรูปที่ 3.11 เช่นเดียวกับผลผลิตจากไพรเมอร์ *gst*₂ (ไม่แสดงข้อมูล)

ก.

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
gi 55245885 gb EAA04712.3	ENSANGP00000021793 [Anopheles ga...	<u>275</u>	4e-73 G
gi 1066808 gb AAB05639.1	heat shock protein 82 [Anopheles ...	<u>273</u>	1e-72
gi 48101604 ref XP_395168.1	similar to 90-kDa heat shock p...	<u>253</u>	1e-66 G
gi 12005809 gb AAG44630.1	90-kDa heat shock protein HSP83 ...	<u>252</u>	2e-66
gi 48096442 ref XP_392456.1	similar to 90-kDa heat shock p...	<u>251</u>	6e-66 G
gi 13699184 dbj BAB41209.1	90-kDa heat shock protein [Bomb...	<u>248</u>	4e-65

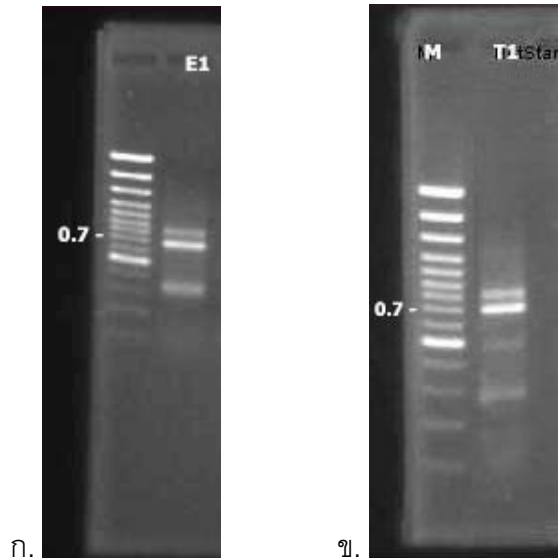
ข.

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
gi 55233521 gb EAA01116.3	ENSANGP00000018348 [Anopheles ga...	<u>274</u>	6e-73 G
gi 5689848 emb CAB51918.1	apolipophorin precursor protein ...	<u>98</u>	6e-20
gi 50404098 gb AAT76806.1	apolipophorin [Galleria mellonella]	<u>94</u>	9e-19
gi 48096606 ref XP_392490.1	similar to apolipophorin precu...	<u>79</u>	3e-14 G
gi 24638795 ref NP_524634.2	CG11064-PA [Drosophila melanog...	<u>65</u>	8e-10 G
gi 1511646 gb AAC47284.1	retinoid- and fatty acid-binding ...	<u>65</u>	8e-10
gi 7511788 pir T18358	apolipophorin precursor protein - to...	<u>62</u>	4e-09
gi 54640008 gb EAL29248.1	GA10736-PA [Drosophila pseudoobs...	<u>55</u>	5e-07

รูปที่ 3.11 ผลของการทำ BlastX ก.ผลผลิตจากไพรเมอร์ *gst*₅ ข. ผลผลิตจากไพรเมอร์ *gst*₆

ผลผลิตจากไพรเมอร์ *gst**o**1* ได้ผลผลิตขนาดตามที่คาดไว้ คือ ประมาณ 750 คู่เบส และเมื่ออ่านลำดับเบสพบว่าเหมือนยีน *gst**o**1* ของยุง *An. gambiae* (ไม่แสดงข้อมูล)

ผลผลิตจากไพรเมอร์ *gst**e**1* และ *gst**t**1* มีขนาดยาวกว่าที่คาดหวังไว้ (850 คู่เบส) แต่เมื่ออ่านลำดับเบสพบว่า มี stop codon อยู่ภายใน จึงออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับบริเวณรหัสเท่านั้น ซึ่งจากไพรเมอร์ใหม่ได้ผลผลิตขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ตามที่คาดหวังไว้) ดังรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.12 การทำ 1% agarose gel electrophoresis ก. ไพรเมอร์ใหม่ของ *gst**e**1* ข. ไพรเมอร์ใหม่ของ *gst**t**1* โดย M คือ GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

ซึ่งผลการอ่านลำดับเบสพบว่าเหมือนยีน *gst**e**1* และ *gst**t**1* ของยุง *An. gambiae* ตามลำดับสรุปได้ว่าสามารถแยกบริเวณรหัสของยีน *gst* ได้ 3 ยีน และตั้งชื่อว่า *Anopheles dirus* glutathione S-transferase epsilon class sequence 1 (*adgst**e**1*), *Anopheles dirus* glutathione S-transferase omega class sequence 1 (*adgst**o**1*) และ *Anopheles dirus* glutathione S-transferase theta class sequence 1 (*adgst**t**1*)

2.1.2 การโคลนชิ้น *adgst**e**1*, *adgst**o**1* และ *adgst**t**1* เพื่อการแสดงออกใน *E. coli*

ตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I โคลนเข้า pET3a คัดเลือกจากขนาด หากเป็นดีเอ็นเอสายผสมจะมีขนาดใหญ่กว่าจึงเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า pET3a ในการทำ 1% agarose gel electrophoresis (ไม่แสดงข้อมูล) จากนั้นตรวจสอบทิศทางการแทรกของดีเอ็นเอสายผสมด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ไม่แสดงข้อมูล) จาก *adgst**e**1* ได้ 2 โคลน คือ *adgst**e**1* clone 21 และ clone 34 เมื่อเมื่อแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง และเมื่อเปรียบเทียบกับ *aggste**1* พบว่าเหมือนถึง 74 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 3.13 จึงสรุปได้ว่า *adgst**e**1* clone 34 เป็น wild type (WT) เนื่องจากเหมือน *aggste**1* มากกว่าและเมื่อพบบ่อยมากที่สุดจากการโคลนหลายครั้ง (ไม่แสดงข้อมูล) เรียกเป็น *aggste**1* ส่วน *adgst**e**1* clone 21 เหมือนเป็น mutant ที่พบจึงเรียกว่า *adgst**e**1* R139H

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
elclone34 : MPKPVLTYIHLSPPCRAVELTARALGLEFEHKIVNLVAGEQLKPEFVKLNPKHTVPVLDDGGTIIITESHAIMIYLVRKYG---G : 81
elclone21 : MPKPVLTYIHLSPPCRAVELTARALGLEFEHKIVNLVAGEQLKPEFVKLNPKHTVPVLDDGGTIIITESHAIMIYLVRKYG---G : 81
aggste1   : MPKPVLTYVHLSPPCRAVELTAKALGLELERKLVNLLAGENLTPEFLKLNPKHTIPVLDDNGTIIISESHAIMIYLVRKYGQGEG : 84

      *           100          *           120          *           140          *           160
elclone34 : DDALYPSDLVQQARVNEALHFESGVLFARLRFITELVFFKRKPEVPEDRIELVVRTAYRLLEDLSLADDFVAGPQLTIADFSCVST : 165
elclone21 : DDALYPSDLVQQARVNEALHFESGVLFARLRFITELVFFKRKPEVPEDRIELVVRTAYRLLEDLSLADDFVAGPQLTIADFSCVST : 165
aggste1   : KDALYPTDIVEQARVNEALHFESGVLFARLRFITELVFFARKPEIPEDRIEYVRTAYRLLEDLSLQSDYVAGSRMTIADLSCISS : 168

      *           180          *           200          *           220
elclone34 : VASTLGFITATAEEFPRIHAWIARLKQLPYEEANGVGAAELGQLVTKQLEANRQA : 221
elclone21 : VASTLGFITATAEEFPRIHAWIARLKQLPYEEANGVGAAELGQLVTKQLEANRQA : 221
aggste1   : VASMVGFIPIMERSEFPRVHGWIERMKQLPYEEINGAGATELAEFIVDMLAKNAKL : 224

```

รูปที่ 3.13 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลได้จาก *adgste1* clone 34 (*aggste1*) clone 21 (*adgste1* R139H) และ *aggste1* ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc โดยลูกศรชี้กรดอะมิโนที่แตกต่างกันของ *adgste1* clone 21 และ clone 34 หากกรดอะมิโนเหมือนกันใช้อักษรสีเดียวกัน

ยีน *adgstt1* ได้ 4 โคลนที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน (โคลน 1, โคลน 2, โคลน 3 และ โคลน 8) และเมื่อเปรียบเทียบพบว่าเหมือน *adgstt1* 78-80 เปอร์เซ็นต์ โดยที่โคลน 2 จะเหมือนมากที่สุด (80 เปอร์เซ็นต์) จัดเป็น wild type ดังตารางที่ 3.1

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
Tlclone2 : MSKNLKYYYDILMSQPSRALWIFLEKTKIPYERCLVNLGKAHHLTDDFKAINRFQKVPCIANQINLAESVAILRYLCREYKVPDH : 85
Tlclone3 : MSKNLKYYYDILMSQPSRALWIFLEKTKIPYERCLVNLGKAHHLTDDFKAINRFQKVPCIANQINLAESVAILRYLCREYKVPDH : 85
Tlclone8 : MSKNLKYYYDILMSQPSRALWIFLEKTKIPYERCLVNLGKAHHLTDDFKAINRFQKVPCIANQINLAESVAILRYLCREYKVPDH : 85
Tlclone1 : MSKNLKYYYDILMSQPSRALWIFLEKTKIPYERCLVNLGKAHHLTDDFKAINRFQKVPCIANQINLAESVAILRYLCREYKVPDH : 85
aggstT1  : MSKNLKYYYDILMSQPSRALWIFLEKTKIPYERCLVNLGKAHHLTDDFKAINRFQKVPCITDSQIKLAESVAIFRYLCREYKVPDH : 85

      *           100          *           120          *           140          *           160          *
Tlclone2 : WYPHDSRRRARVDEYLEWQHHTNRSACAVYFYQYMWLRPRMFGSKVDPKRADQYRVQMEVCLDFIEREFLGQGAPFIVGNEISVAD : 170
Tlclone3 : WYPHDSRRRARVDEYLEWQHHTNRSACAVYFYQYMWLRPRMFGSKVDPKRADQYRVQMEVCLDFIEREFLGQGAPFIVGNEISVAD : 170
Tlclone8 : WYPHDSRRRARVDEYLEWQHHTNRSACAVYFYQYMWLRPRMFGSKVDPKRADQYRVQMEVCLDFIEREFLGQGAPFIVGNETSVAD : 170
Tlclone1 : WYPHDSRRRARVDEYLEWQHHTNRSACAVYFYQYMWLRPRMFGSKVDPKRADQYRVQMEVCLDFIEREFLGQGAPFIVGNEISVAD : 170
aggstT1  : WYPADSRRLQALVDEYLEWQHHTNTRATCAIYFYQYVWLRPRMFGTKVDPKQAEKYRGQMEGTLDIFIERYLGSARFIAGDEITVAD : 170

      180          *           200          *           220
Tlclone2 : LVAICEIEQPKMAGYDPCNGRPNLTQWMERVREETNPFYDQAHKFVNKLAQDSIAKNKL : 229
Tlclone3 : LVAICEIEQPKMAGYDPCNGRPNLTQWMERVREETNPFYDQAHKFVNKLAQDSIAKNKL : 229
Tlclone8 : LVAICEIEQPKMAGYDPCNGRPNLTQWMERVREETNPFYDQAHKFVNKLAQDSIAKNKL : 229
Tlclone1 : LVAICEIEQPKMAGYDPCNGRPNLTQWMERVREETNPLYDQAHKFVNKLAQDSIAKNKL : 229
aggstT1  : LLAACEIEQPRMAGYDPCCEGRPNLTQWMAVREESTNPFYDQAHKLVNKFAGDTASKAKL : 229

```

รูปที่ 3.14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลได้จาก *adgstt1* โคลน 1, โคลน 2, โคลน 3, โคลน 8 และ *aggstt1* ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc หากกรดอะมิโนเหมือนกันใช้อักษรสีเดียวกัน